

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE

BROMATOLOGIA-TOXICOLOGIA Y ANALISIS QUIMICO APLICADO

PERSISTENCIA DE PESTICIDAS EN EL SUELO

Memoria presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela para optar al Grado de Doctor en Farmacia, por

ROSALIA DIAZ GONZALEZ

D. JESUS SIMAL LOZANO, Catedrático de Análisis Químico Aplicado y Bromatología-Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago,

CERTIFICA: Que la tesis doctoral *Persistencia de pesticidas en el suelo*, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Bromatología-Toxicología y Análisis Químico Aplicado de la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela.

Santiago de Compostela, abril de mil novecientos setenta y seis.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Simal', enclosed within a hand-drawn rectangular box.

Deseo expresar mi agradecimiento a los profesores D. Jesus Simal Lozano, por su dirección y a D. Aniceto Charro Arias y D. José M^a Creus Vidal por su continua orientación y colaboración.

También a mis compañeros, su inestimable ayuda.

Al Departamento de Edafología de la Facultad de Farmacia, dirigido por el Prof. Dr. D. Francisco Guitián Ojea y al Prof. D. Francisco Diaz-Fierros Viqueira, por la colaboración prestada en el análisis de la estructura, textura y composición del suelo.

Así mismo hago constar mi gratitud al Ministerio de Educación y Ciencia por la Beca de Formación de Personal Investigador.

INDICE

1.- INTRODUCCION

- 1.1.- Procedencia de los pesticidas del suelo y cosecha.
- 1.2.- Factores que afectan a la persistencia
- 1.3.- Control de residuos
- 1.4.- Plan de trabajo

2.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

- 2.1.- Extracción
- 2.2.- Purificación
- 2.3.- Técnicas de análisis
 - 2.3.1.- Cromatografía de gases
 - 2.3.1.1.- Técnicas de confirmación en GLC
 - 2.3.2.- Actividad anticolinesterásica
 - 2.3.2.1.- Técnicas de identificación de pesticidas inhibidores de la colinesterasa.
- 2.4.- Análisis cuantitativo
 - 2.4.1.- Métodos de cálculos en GLC
 - 2.4.2.- Métodos de cálculo de la actividad anticolinesterásica.

3.- PARTE EXPERIMENTAL

3.1.- Aparatos y Material

3.2.- Reactivos

3.3.- Muestras

3.3.1.- Toma de muestras

3.3.2.- Conservación de las muestras

3.3.3.- Localización y descripción de la parcela de terreno objeto de estudio.

3.3.4.- Preparación de las muestras.

3.4.- Organigrama del proceso analítico seguido

3.5.- Extracción: elección de solvente y estudio de la recuperación

3.5.1.- Maceración con acetonitrilo.

3.5.1.1.- Muestras con humedad superior al 75%

3.5.1.2.- Muestras con humedad inferior al 75%

3.5.1.3.- Suelos

3.5.2.- Reparto en acetonitril/eter de petróleo

3.5.3.- Reparto en acetonitrilo/diclorometano

3.6.- Purificación de extracto etereo

3.6.1.- Estudio de la recuperación en el proceso de purificación

3.6.2.- Normalización del florisil

3.7.- Análisis cualitativo del extracto etereo

3.7.1.- Condiciones de trabajo en cromatografía de gases.

3.7.2.- Detectores empleados.

- 3.7.3.- Preparación del detector termoiónico
- 3.7.4.- Comparación de respuesta entre los diferen
tes detectores
- 3.7.5.- Introducción de las muestras
- 3.7.6.- Criterios de identificación y confirmación
 - 3.7.6.1.- Tiempos de retención relativos al Aldrín
 - 3.7.6.2.- Empleo de la columna de florisil
 - 3.7.6.3.- Uso de distintas columnas en GLC
 - 3.7.6.4.- Uso de los detectores FID, ECD y CKITD
 - 3.7.6.5.- Valores "p"
 - 3.7.6.6.- Radiaciones ultravioleta
 - 3.7.6.7.- Pruebas químicas.
 - 3.7.6.7.a.- Confirmación de pp'DDT
 - 3.7.6.7.b.- Confirmación de pp'DDE
 - 3.7.6.7.c.- Confirmación de Aldrín
 - 3.7.6.7.d.- Confirmación de Dieldrín
 - 3.7.6.7.e.- Confirmación de PCB's
- 3.7.7.- Interpretación cualitativa de los croma t ogra
mas.
- 3.8.- Análisis cuantitativo del extracto etereo
 - 3.8.1.- Influencia del volumen inyectado
 - 3.8.2.- Zona de respuesta lineal del detector
 - 3.8.3.- Otros factores: temperatura, envejecimiento
de la columna
 - 3.8.4.- Interferencias
 - 3.8.5.- Límites de detección: absolutos y relativos a
a las muestras.

- 3.9.- Medida de la actividad anticolinesterásica en el extracto de diclorometano.
 - 3.9.1.- Fundamento
 - 3.9.2.- Valoración potenciométrica de la actividad anticolinesterásica.
 - 3.9.3.- Procedimiento.
 - 3.9.4.- Cálculos.
 - 3.9.5.- Límites de detección absolutos y relativos a las muestras
 - 3.9.6.- Recuperación del Dipterex y Sevín
 - 3.9.7.- Estudio de la estabilidad del Dipterex y Sevín.
- 3.10.- Cromatografía en capa fina.
 - 3.10.1.- Procedimiento y resultados obtenidos con solución patrón.
 - 3.10.2.- Aplicación del método a distintas muestras
- 3.11.- Resultados y discusión
 - 3.11.1.- Resultados de los extractos etéreos
 - 3.11.2.- Resultados en los extractos de diclorometano.

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS

AOAC = Association of Official Analytical Chemists.

DC-200 = Metil silicona o Polidimetil siloxano

DDE = Diclorofenil dicloretileno

DDT = Diclorodifenil tricloroetano

DDUP = Vapona o Dimetil 2,2 diclorovinil fosfato

ECD = Detector de captura de electrones (Electron Capture Detector)

FDA = Food and Drug Administration

FID = Detector de ionización de llama de hidrógeno (Flame Ionization Detector)

GC = Cromatografía de gases (Gas-chromatography)

GLC = Cromatografía de gases (Gas Líquid Chromatography)

HCH = Hexaclorocido hexano

KClTD = Detector termoiónico de cloruro potásico (potassium chloride termoionic detector).

ND = No detectable

NM = No medible

PCB's = Policlorobifenilos

ppb = $\mu\text{g}/\text{Kg.}$ = $\mu\text{g}/\text{g}$ = partes por mil millones

ppm = mg/Kg = $\mu\text{g}/\text{g}$ = partes por millón.

QF-1 = Metil propil silicona fluorurada o polifluoruro de propilmetilsiloxano.

SEO = Sociedad Española de Oxígeno

TLC = Cromatografía en capa fina (Thinlayer chromatography)

Tr = Tiempo de retención

Trr = Tiempo de retención relativo al Aldrín

NOTA.- En algunas siglas se han mantenido las iniciales inglesas por ser de uso frecuente en los trabajos científicos.

SINONIMOS DE LOS PESTICIDAS APLICADOS

Lindano = isómero γ del HCH

Sevín = carbaril = 1-naftil N-metilencarbamato

Dipterex = Dylox = Triclorofon = 0,0-Dimetil 2,2,2-Tricloro-1-hidroxietil fosfonato.

PERSISTENCIA DE PESTICIDAS EN EL SUELO

I.- INTRODUCCION

La creciente utilización de pesticidas, que con interés rentable, se manifiesta desde la Segunda Guerra Mundial, (fecha en la que la industria de estos productos empieza un desarrollo vertiginoso), entraña, a la vez, una serie de problemas para la salud humana, que ha obligado a organismos internacionales como la FAO/OMS y OCDE a promover estudios encaminados al conocimiento de los niveles de contaminación y sus posibles efectos.

Fruto de estos estudios han sido una serie de restricciones en el uso de algunos plaguicidas. Otras tendencias han intentado rebatir los

principales motivos que justifican dicha restricción, con argumentos de discutible solidez, pero, por otra parte, merecedores de tenerse en cuenta.

Los peligros de la utilización del DDT (entre nosotros restringido por Orden del Ministerio de Agricultura del 22 de Marzo de 1.971 (B. O. del Estado del día 30, 5118) provocaron estudios más profundos sobre la toxicidad de pesticidas usados en agricultura y ganadería, contaminantes, a su vez, de ríos, mares y de los cultivos de estos medios. Todas estas circunstancias nos han llevado a plantear un estudio sobre resíduos de pesticidas en medio ambiente y más concretamente a poner a punto diferentes métodos seguidos en análisis de multiresíduos para establecer los niveles de resíduos y su evolución en una parcela de cultivo así como en las cosechas de ella obtenidas a lo largo de 5 años.

1.- PROCEDENCIA DE LOS PESTICIDAS DEL SUELO Y COSECHA:

El origen de estos compuestos es variado. Su presencia se debe principalmente a un tratamiento directo del suelo al combatir las diversas plagas de insectos y hierbas adventicias, antes o des-

pues de la siembra. También se pueden encontrar como consecuencia de la pulverización aérea de cultivos ya que una parte de los productos se deposita en el suelo, ya sea en el momento de su aplicación o con posterioridad a ella. La procedencia puede ser indirecta como consecuencia del arrastre producido por la lluvia y el viento o, en ocasiones, por enterramiento de plantas que han sido tratadas, costumbre bastante frecuente en agricultura.

La presencia de pesticidas en los productos agrícolas, también puede ser directa o indirecta. Esta última tiene lugar por absorción del existente en el suelo contaminado por los mecanismos señalados anteriormente.

2.- FACTORES QUE AFECTAN A LA PERSISTENCIA:

La persistencia de los pesticidas en el suelo es muy variable y está en función de diversos factores que afectan a su absorción, desorción y movimiento. Estos factores son muy diversos, dependientes del pesticida, de la naturaleza del suelo, de los organismos que en él viven, de la cosecha, relacionados todos ellos entre sí y de cierta complejidad como veremos.

a) Influencia de la estructura del pesticida:

Las características físico-químicas del pesticida como posibles factores que afectan su adsorción por el suelo, han sido consideradas por diversos autores.

REINOLDS y METCALF (1), comprueban que el desplazamiento del pesticida en el terreno está directamente relacionado con la solubilidad en agua del mismo, lo que está de acuerdo con la influencia generalmente aceptada de la cantidad de agua que atraviesa el suelo.

EDWARDS (2), estudia la influencia de la presión de vapor, de gran importancia sobre todo cuando el pesticida se encuentra en capas superficiales.

LAMBERT (3), encuentra una relación entre la adsorción del pesticida por el suelo y el número de puntos que en la molécula pueden formar enlaces de hidrógeno.

HARRIS (4), en un estudio comparativo de movilidades, indica que éstas son mínimas en el caso de los organoclorados y máxima en los herbicidas derivados del ácido benzoico.

BOBBY L. GLAS (5), llega a la conclusión

de que los pesticidas electronegativos pueden ser susceptibles de degradación en condiciones anaerobias, mediante captura de electrones proporcionados por la materia orgánica con el ión ferroso como intermediario.

b) Naturaleza del suelo:

Todas las características del pesticida que puedan intervenir en su adsorción hay que considerarlas en interacción con el suelo. Así la conclusión hallada por LAMBERT (3), solo se cumple cuando el principal adsorbente es la materia orgánica.

El suelo influye en la absorción producida por las cosechas. Como cabe esperar es más rápida en suelos arenosos que en suelos con alto contenido en materia orgánica, y así lo pudo demostrar HARRIS y SAND (6).

Esta relación no se puede generalizar en toda clase de pesticidas aun dentro de una estructura similar. BEALLY y NASH (7) señalan que la absorción de heptaclor, dieldrín y DDT por el maiz y alfalfa está relacionada con el contenido en materia orgánica y en cambio, ésta no afecta a la del Endrín que por otra parte está

influenciada por el contenido en limo.

WOLCOTT (8), demuestra que la materia orgánica es el componente que más afecta a la fijación, existiendo una estrecha relación entre ésta y la interacción coloide orgánico - coloide mineral (9).

Esta influencia de la materia orgánica está sujeta a variaciones (10) originadas en unos casos por la humedad que se interpone entre la superficie de adsorción y el pesticida hidrófobo, así como por el grado de humidificación del material orgánico con el cual crece la adsorción de los pesticidas no iónicos.

En estudios hechos con pesticidas iónicos (ácidos 2-4 D, ácidos clorofénicos...), FARMER (11), encuentra que los catiónicos son fuertemente adsorbidos por suelos con alto contenido en arcilla y materia orgánica ya que éstas contienen más cargas negativas que positivas, siendo sin embargo la fijación más débil para pesticidas aniónicos.

Hay un factor del suelo, el pH, que en relación con la constante de disociación del pesticida, puede determinar el que se produzca la fijación mediante enlaces de hidrógeno, lo que

pudo comprobar FARMER (11) en estudios llevados a cabo con herbicidas.

Sin embargo para pesticidas con estructura química más estable como son los organoclorados Lindano y Aldrín, anteriormente, SWANSON y col. (12) y BOLLEN y col. (13), no encontraron relación entre el pH y la adsorción.

c) Vegetación:

La absorción por las plantas además de considerarla como una vía eventual de desaparición del pesticida cuyo destino era el suelo, hemos de considerarla también, por su transcendencia cuando se trata de alimentos, como vía de penetración de pesticidas a ellas dirigidos.

Sea cual fuere la intención de la aplicación ha de tenerse en cuenta que en relación con la distribución del pesticida en la planta CARO (14) en un trabajo hecho con maiz, llega a la conclusión de que las hojas superiores tienen menor cantidad de pesticida, no solo porque son las mas jóvenes y estuvieron menos tiempo expuestas sino tambien debido a que la densidad de vapor del pesticida es superior en las capas de aire cercanas al suelo y se presenta una acu

mulación del mismo en esta zona. Esta circunstancia es necesario considerarla ya que, si bien el contenido en pesticida de las plantas procede en parte de la absorción por las raíces, el principal mecanismo de acumulación es debido al depósito de pesticida en fase vapor (15).

Pero no solo las plantas absorben el pesticida del suelo sino que incluso pueden modificar el que se encuentra en él, como demostró BURGE (16), al comprobar la descomposición anaerobia del DDT, que en el suelo pasa a DDD, por los componentes volátiles de la alfalfa.

d) Fauna:

WAY y SCOPER (17), han estudiado la influencia de la fauna en la persistencia de los pesticidas y ha comprobado que ésta se puede aumentar si previamente el terreno es tratado para exterminar la fauna; es un hecho que a menor escala se pudiera dar realmente por el constante uso de estos productos.

GISH (18) ha estudiado la relación entre el contenido de pesticidas organoclorados en tierras y diferentes organismos: caracol, lombriz, escarabajo,..... y ha observado que es supe-

rior en los invertebrados que en la tierra (a excepción del escarabajo). La cantidad de insecticida en lombrices, varía directamente con la cantidad en suelo independientemente del cultivo o tipo de suelo.

Tambien se ha observado que ciertos pesticidas producen un aumento de población en algunas especies de invertebrados por ir dirigida su efectividad no a estos sino a los de depredadores (19).

3.- CONTROLES DE RESIDUOS:

Con el fin de paliar o soslayar estos riesgos inherentes a la utilización de pesticidas, se han propuesto diferentes medidas a tomar: utilización de pesticidas menos persistentes y uso de sustancias que reduzcan sus niveles.

En este último sentido se ha comprobado la eficacia del carbón que permite el cultivo en suelos altamente contaminados (20).

Son muy útiles tambien los estudios sobre degradación de pesticidas tanto en suelos como en plantas y la determinación de sus productos

de transformación, a veces de una toxicidad mil veces menor, como en el caso del lindano que da lugar al pentacloro ciclohexano, pero en ocasiones de toxicidad todavía mayor. Investigaciones de este tipo han permitido conocer la vida media de cada pesticida y con ello determinar el tiempo aconsejable que ha de transcurrir entre la aplicación y la recogida de la cosecha según que haya sido aplicado al suelo o a la planta. Es, sin embargo, este valor un dato de poca significación, ya que la persistencia y metabolismo de cualquier pesticida, como se ha señalado, depende de una gran variedad de factores.

Una forma de conocer la contaminación por residuos sin tener en cuenta todos estos factores es el estudio realizado por CARRASCO y col. (21), sobre la contaminación por plaguicidas de los alimentos constituyentes de la dieta media española, a fin de poder calcular la ingestión de residuos diarios por persona, la cual ha establecido 78 $\mu\text{g.}$ de DDT (op'-DDT + pp'-DDT y pp'-DDE) y de 13,8 $\mu\text{g.}$ de γHCH .

Esta contaminación calculada a partir de alimentos del mercado de Valencia debe de ser superior a la media nacional y es de igual orden aunque algo superior a la encontrada en EE.UU.

(55 $\mu\text{g}/\text{día}$ de DDT y 3 $\mu\text{g}/\text{día}$ de γ HCH), en Inglaterra (44 $\mu\text{g}/\text{día}$ de DDT y 6,6 $\mu\text{g}/\text{día}$ de γ HCH) según SMITH (22) y ABBOTT y col. (23) respectivamente. No aparecen sin embargo otros pesticidas de gran toxicidad presentes en las cosechas de EE.UU. e Inglaterra.

Los valores encontrados son muy inferiores a los considerados por la FAO/OMS (24) como máximos admisibles para estos pesticidas (250 $\mu\text{g}/\text{día}$ de DDT y 500 $\mu\text{g}/\text{día}$ de γ HCH) para personas de 50 Kg. de peso.

Por otro lado, en este Departamento se han llevado a cabo estudios sobre la contaminación por pesticidas de aguas y moluscos de la Ría de Arosa, y los valores encontrados fueron 1/100 a 1/5000 para el lindano y 1/100 a 1/150 para el total de DDT respecto a los niveles señalados como máximos razonables por la *Federal Committee on Water Quality Criteria* (5,0 y 0,5 ppb).

4.- PLAN DE TRABAJO:

Por todo lo comentado hemos pretendido establecer niveles residuales de pesticidas orgánicos (organoclorados, fosforados y carbamatos)

en el suelo de un campo de cultivo en el que se recogen maíz, patatas, grelos y judías que solamente han sido sometidas a tratamientos muy elementales con estas sustancias, de acuerdo con los consejos dados por las oficinas de Extensión Agraria.

Para este estudio ha sido necesario en primer lugar, poner a punto diferentes métodos analíticos requeridos en las diferentes etapas del complejo análisis de multiresíduos que lleva implícito la utilización, por una parte de la cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama de hidrógeno, captura de electrones y un detector análogo al termoiónico elaborado personalmente para la detección de fosforados, y por otro lado, la utilización de técnicas potenciométricas para la comprobación de pesticida inhibidor de la colinesterasa, algunos de los cuales, no pueden ser detectados directamente en las condiciones habituales de la CG y es necesario el empleo de estas otras técnicas.

II.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Los pesticidas, como se ha indicado, han dado lugar a numerosas publicaciones sobre las más diversas facetas: efectividad, forma de aplicación, toxicidad, legislación, persistencia, etc. Y sobre todo las relacionadas con la problemática de su análisis cuali y cuantitativo, por lo que antes de proceder a la descripción de los métodos utilizados en la parte experimental es conveniente estudiar los antecedentes de las diferentes etapas que implica este análisis: extracción, purificación, análisis cualitativo y análisis cuantitativo.

1.- EXTRACCION:

Los métodos de extracción de los pesticidas han sufrido modificaciones sucesivas tanto en la forma de realizarla, como en el disolvente o disolventes utilizados. Hoy se ha llegado a una forma de extracción casi única o más generalizada que es la extracción por maceración y agi

tación mecánica, pero se han usado también la extracción en superficie y el método soxhlet.

La extracción en superficie fué empleada, entre otros, por WICHMANN y col. (25) para extraer residuos de DDT, con benceno, en la superficie de manzanas.

En esta técnica no se trocea el material y se emplea un solo disolvente, el más idóneo para el pesticida, por lo que GUNTHER y BLINN (26) en un estudio sobre el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio entre las concentraciones en la sustancia y solvente, encontraron que era muy grande. Este sencillo proceso permitía la obtención de extractos poco contaminados, sin embargo no había una extracción cuantitativa de los residuos, combinados con la mayor parte de los materiales vegetales.

La extracción exhaustiva mediante el empleo del Soxhlet, fué utilizada para la extracción de pesticidas de los productos secos finamente divididos, pero presenta diferentes inconvenientes, de un lado el secado de las muestras frescas con la consiguiente pérdida de pesticida que ello implica y de otro la gran cantidad de impurezas que extraen por este procedimiento lo que lleva consigo un estricto proceso de pu

rificación. KLEIN (27) y KLEIN y col. (28), hacen una amplia comparación con otros métodos para la extracción de residuos de DDT en espinacas y comprueban que la técnica además de resultar larga deja pesticida sin extraer al que denominan residuo fijado.

CHIBA y MORLEY (29), en un estudio hecho sobre los factores que afectan la extracción de Aldrín y Dieldrín en suelo, por distintos procedimientos, señalan para el método Soxhlet los in convenientes ya citados no obstante su buena capacidad de extracción..

La técnica de maceración y agitación prolongada en presencia de solventes, es el procedi miento utilizado ordinariamente para la extracción de pesticidas tanto de tejidos vegetales co mo de tierras u otras muestras.

En un principio las tierras eran agitadas en presencia de un solo solvente inmiscible en agua; tal era también el método utilizado para la extracción de residuos en alimentos de alto contenido graso: extracción de la grasa y posterior partición del solvente orgánico de ésta, con el acetonitrilo. Comparando este método con el uso de una mezcla de solventes polar y no polar, se encuentra con esta última modalidad una

recuperación mayor en la extracción, quizá por formar con los zumos vegetales una fase homogénea, haciendo salir el contenido de las células para luego ser sometido a partición con el solvente no polar.

LICHTENSTEIN (30), emplea en análisis de organoclorados en cosechas de suelo tratado, la técnica de maceración con mezcla de benceno-alcoholisopropílico (2:1) para DDT, y hexano-alcohol isopropílico (2:1) para Aldrín y Dieldrín.

MILLS (31), utiliza como procedimiento general de extracción para alimentos grasos y no grasos la mezcla hexano-isopropanol.

JOHNSON (32), comprueba que la mezcla anterior puede ser sustituida con igual eficacia extractiva por un solo disolvente, acetonitrilo, y con la ventaja de extraer menos materia colorante. Este método que JOHNSON lo utiliza para la extracción de Dieldrín y Aldrín, había sido usado con anterioridad por MODDES y COOK (33) para extraer paratión. MILLS y col. (34), lo utilizan en una técnica rápida de análisis para multiresiduos de organoclorados y algunos organofosforados en alimentos no grasos, seguida de purificación del extracto en columna de florisil. Dicho procedimiento es el fundamento del empleado hoy

por la Food and Drug Administration para análisis de residuos en alimentos no grasos (35).

NELSON (36) demuestra que por el método de MILLS y col. (34) pueden ser recuperados algunos pesticidas organofosforados. Varios investigadores de FDA demuestran también que el paratión metil paratión, diazinon, etion, carbofenotion y ronnel pueden ser cuantitativamente recuperados por este método además de los pesticidas organoclorados.

Posteriormente fueron introducidas algunas modificaciones en el método de MILLS y col. (34) reformas todas ellas hechas sobre la misma línea de trabajo, encaminadas a la extracción de algunos tipos más de muestra como huevos (37) y productos lácteos (38).

BERTUZZI y col. (39), demuestran que la extracción con acetonitrilo es deficiente cuando la muestra estaba deshidratada, pero llegan a la conclusión de que siguiendo la técnica de MILLS y col. (34) y usando un acetonitrilo con un 35% de agua, se pueden obtener resultados cuantitativamente buenos para muestras secas y comparables con los obtenidos por extracción exhaustiva en Soxhlet

BURKE y PORTER (40), también comprueban que la extracción de residuos de TDE en coles por este método deja de ser cuantitativa cuando la humedad de la muestra es inferior al 75%.

Posteriormente WILDERMAN y SHUMAN (41), informan de la efectividad de este procedimiento con adición de agua, para la extracción de residuos de DDT en forraje. Además se comprobó que el acetonitrilo es un buen extrayente también para algunos pesticidas carbamatos en frutos y vegetales tales como carbaril (42) y Landrin (43).

STORHERR (44) basándose en el anterior trabajo de Porter y col. recomienda el acetoni-trilo en lugar del diclorometano anteriormente aconsejado para el carbaril en los métodos oficiales de la A.O.A.C. de 1.970 (45).

STORHERR y col. (46) presentan un método general para pesticidas organofosforados en el que el procedimiento de extracción es también con acetonitrilo.

PARDUE (47) en un estudio de recuperación de varios organofosforados, empleando el método de MILLS y col. (34), observa que el Triclor-fon a pesar de no ser detectable en las condi-

ciones de trabajo, es claramente eluible lo que llegan a detectar aplicando las condiciones de GLC de WATTS y STORHERR (48).

RENWALL y AKERBLONT (49) hacen un estudio sobre la determinación de organofosforados y comprueban la eficacia del cloruro de metileno como extrayente, disolvente ya utilizado con anterioridad para organofosforados y entre ellos diptere-
rex (50).

La extracción con acetonitrilo, con variantes que dependen del contenido en grasa, agua y azúcar de la muestra es el método oficial de extracción en los laboratorios de la AOAC (edición de 1.970) para varios pesticidas organoclorados y organofosforados en diversos tipos de alimentos de origen vegetal y animal.

Por otra parte, como hemos visto, este mismo disolvente también da buenos resultados para extracción de algunos carbamatos en estos tipos de muestras. Sin embargo para la extracción de cualquier pesticida en suelos, todavía en 1.970 no existe método oficial en este organismo.

CHIBA y MORLEY (29) hacen un estudio sobre extracción de pesticidas organoclorados en suelos obteniendo buenos resultados de recuperación con

algunos disolventes, entre los que el acetonitrilo da unos valores intermedios pero con la ventaja de extraer pocas sustancias interferentes.

Al igual que en los métodos de MILLS para alimentos, la humedad es de gran importancia en suelos y se ha podido comprobar (51) que la recuperación es mala si no se añade al suelo secado al aire un 20%, o si es orgánico un 80%, de agua. Operando de esta forma la desorción del pesticida es tan grande, que otros posibles efectos tales como los debidos al método o al tiempo de contacto entre la muestra y el disolvente, son menos notorios. En este estudio se señala también que la recuperación es mayor cuando la tierra se ha secado al aire y permanece seca desde la fotificación hasta el análisis.

LICHTENSTEIN y col. (52, 53), utilizan acetonitrilo en la extracción de pesticidas del suelo.

SAHA (54) compara varios métodos de extración para residuos de clordano en suelos y llega a la conclusión de que las mejores circunstancias para una buena recuperación se obtienen con la adición de un 20% de agua, un tiempo de contacto de 24 horas y la utilización de la mezcla hexano-

acetona (1:1). Además señala que la adición de agua por encima de un 40% disminuye la recuperación, siendo el margen de aumento el de 30-40%.

2.- PURIFICACION:

A veces, un simple reparto entre dos disolventes como señala BONELLI (55), extrayendo Aldrín con una mezcla de hexano-benceno, es suficiente si los niveles de residuos son relativamente altos. Esta misma circunstancia ha podido ser probada por nosotros como consecuencia del naufragio del Erkowit que cedió varias toneladas de Dieldrín en aguas de Galicia (56). No obstante, si los niveles de residuos son inferiores a ppm hacen falta métodos más rigurosos que los de partición entre dos solventes no miscibles.

En el caso de muestras con alto contenido en grasa y ceras, un método de purificación es la precipitación de estas en acetona a -70°C , separándolas luego por filtración. GRUSSENDORF y col. (57) combinan este método con la utilización del florisil como adsorbente.

Las sustancias interferentes, también pueden ser reducidas o eliminadas por métodos quími

cos tal como hacen BEROZA y col. (58) saponificando las grasas con KOH alcohólica, aunque este tratamiento también modifica algunos pesticidas (veáse más adelante 3.7.6.7.).

Sin embargo, la técnica más frecuentemente empleada es la de poner en contacto el extracto con una sustancia adsorbente tal como el florisil, silicagel, alúmina, carbón o mezcla de estos.

Con frecuencia los adsorbentes fueron utilizados simplemente para separar los productos interferentes. En este sentido BECKMAN (59), emplea florisil para retener impurezas haciendo pasar simplemente una porción alícuota del extracto a través de una columna de este adsorbente.

CAREY (60), purifica extractos de semillas y de vegetales, haciéndolos pasar a través de una columna rellena con la mezcla: magnesia activada/tierra de diatomeas (1:1).

CULLEN y STANOVICK (61), emplean una agitación con el adsorbente cuando tratan de eliminar interferencias en un extracto de cosecha.

Actualmente estos materiales son usados como fase estacionaria en un cromatógrafo líquido

do-sólido, dentro de un proceso de purificación previo al análisis por cromatografía de gases ya que no solo permiten separar los pesticidas de los coextractivos sino también los pesticidas entre sí. Un ejemplo de esta última aplicación asociada a la anterior es el trabajo de JOHNSON (32) que separa Dieldrín y Endrín de otros pesticidas clorados usando florisil y eluyendo primero con 200 cm³ de la mezcla eter etílico/eter de petróleo al 6% (v/v) y luego con 200 cm³ de eter etílico/eter de petróleo al 15% (v/v).

Como se ha indicado, son varios los adsorbentes que se han usado con esta finalidad, y parece lógico hacer un comentario de cada uno:

Carbón. - McLEOD y col. (62), utilizan columna de carbón para separar pesticidas órganoclorados y organofosforados y eluyen la muestra primero con acetonitrilo-hexano (1,5%), v/v, después con cloroformo y por último con benceno. De esta forma logran separar en el primer eluato: Lindano, Heptaclor, Aldrín, Tiodán, pp'DDE, Dieldrín, Captan y los isómeros del DDT. En el segundo, la mayoría de los fosforados y en el tercero Daconil y Dyrene. La utilización de carbón como adsorbente es particularmente aconsejable cuando se trata de separar pesticidas organofosforados ya que

algunos de ellos, solo en este adsorbente, tienen una recuperación superior al 70% (63).

Alúmina.- Otro adsorbente, la alúmina, es usado con éxito en purificación. Se pensó que la alúmina, que es de naturaleza polar, mezclada con otra sustancia apolar como la parafina, podría servir para separar ambas clases de pesticidas: organoclorados y organofosforados. Así lo hizo ERWIN y col. (64), utilizando como eluyente solución acuosa de acetonitrilo (35%), obtuvieron buenos resultados en cuanto a la separación de impurezas procedentes de la muestra. El único inconveniente de éste modo de operar era que la parafina se desvía parcialmente

Para subsanar aquel inconveniente, HOSKINS y col. (65), sustituye la parafina por polietileno insoluble en el eluyente usado.

Así mismo BLIN y col (66) empleando también alúmina, eluyen primero con n-hexano y luego con cloroformo para separar residuos de Aldrín y Dieldrín en el suelo.

LAWS y WEBLEY (50), combinan ambos métodos de purificación, alúmina y carbón, en extractos de plantas que contienen pesticidas organo-

fosforados previa separación de éstos en dos fracciones: solubles en eter de petróleo y solubles en agua. La fracción de eter de petróleo es cromatografiada sobre óxido de alúmina y la otra sobre carbón.

Comparando la efectividad de las columnas de alúmina y carbón, ADAMS y col. (67), observan que en la columna de carbón obtienen una eficacia inferior debido a que deja pasar más sustancias interferentes.

Silicagel. - El ácido silícico o silicagel, $\text{SiO}_2\text{H}_2\text{O}$, aunque menos usado que los anteriores, también es descrito por varios autores como adsorbente adecuado en algunas purificaciones.

KADOON (68) empleando Silicagel y eluyendo con una cantidad de benceno comprendida entre 12-240 ml., logra buena recuperación exepcto para Malatión y Diazinon que necesitan 8% de acetato de etilo en Benceno.

Mezclas. - En un itento de obtener capacidades adsorbentes adecuadas también se ha experimentado con mezclas de distintos adsorbentes. En este sentido BOWMAN y JOUNG (69), purifican extractos de cereales en columna de florisil-celita, eluyen

do con hexano. Algunos autores emplean cuatro o más adsorbentes distintos, lo que hace engorroso este tipo de procedimientos debido además a la necesidad de verificar la capacidad de adsorción en cada lote de adsorbente.

Florisil. - El florisil, silicato magnésico sintético, es probablemente el adsorbente más usado con fines de purificación en análisis de residuos y la información que de su uso puede encontrarse es muy extensa. Recogiendo algunos trabajos aplicados a suelos, citaremos:

LICHTENSTEIN y SCHULZ (70), purifican extractos de suelos tratados con Aldrín, también por cromatografía sobre florisil. Separan el Aldrín del Dieldrín eluyendo primero con n-hexano y luego con benceno-n-hexano al 25% (v/v).

MILLS (31), utiliza la columna de florisil con éxito en la purificación con varios pesticidas, entre ellos los isómeros del DDT, BHC, HEPTACLOR, Heptaclor epóxido, etc..., usando la mezcla de eter etílico/eter de petróleo al 6% (v/v) como eluyente. No encuentran eluyente idóneo para separar Dieldrín y Endrín.

JOHNSON (32), separa el Dieldrín y Endrín eluyendo con la mezcla eter etílico/eter de pe-

tróleo al 15% (v/v). De esta forma los pesticidas organoclorados más frecuentes, pueden ser separados en dos fracciones: eluibles en la mezcla del 6% (v/v) (1° eluato) y eluibles en la mezcla del 15% (v/v) (2° eluato). Este método con pequeñas modificaciones es aplicado a muestras con un contenido en grasa igual o inferior al 2% y da buenas recuperaciones en los 21 organoclorados estudiados por MILLS y col. (34).

Hay cierta variación en la forma de activar el florisil. LANGLOIS y col. (71), lo calientan a 140° durante 12-14 horas y lo desactivan luego parcialmente con un 5% de agua dejando pasar 48 horas antes de su uso.

BURQUE Y MALONE (72), aconsejan el uso de florisil calcinado a 1250°F (670-680°C). durante tres horas.

MILLS y col. (73), describen un método rápido para determinar la capacidad de adsorción del florisil, basado en la adsorción del ácido láurico de una solución de hexano. Con esta medida es fácil determinar el peso de florisil necesario para una correcta purificación.

En los métodos oficiales de purificación de la Food And Drug Administration (FDA) (74), se

recomienda la activación a 650°C durante tres horas seguida de una estancia en recipiente cerrado a 130°C durante cinco horas como mínimo. El florisil así activado se mantiene en la oscuridad y puede conservarse durante dos días al cabo de los cuales es necesario volver a calentar a 130°C. Aconsejan que en cada lote activado, se determine antes de su uso el grado de adsorción, y de acuerdo con este, se ajuste la cantidad de florisil en la columna por el anterior método de MILLS.

HALL (75), obtiene buenas recuperaciones para varios pesticidas organoclorados y organofosforados aplicando el anterior método de Mills a 10 lotes distintos de florisil.

En general el florisil es un adsorbente excelente para la purificación con organoclorados. No obstante hay algunos organo-fosforados eluibles por el método de MILLS y col. (34) en el 1° y 2° eluatos y algunos en el 3° eluato obtenido con eter etílico eter de petróleo al 50% como de muestra WESSEL (76).

El método de MILLS y col. (34) es oficial en la Association Official Agricultural Chemists (AOAC), 1.975 (77) para 14 organo clorados, 7 organofosforados y ningún carbamato.

2.3.- Técnicas de análisis:

Dado el número elevado de pesticidas utilizados actualmente, para el análisis de residuos se han propuesto técnicas de detección múltiple entre las que merecen destacar la cromatografía de gases y la medida de la actividad anticolinesterásica auxiliadas de diferentes pruebas de confirmación.

2.3.1.- *Cromatografía de gases:*

La cromatografía de gases es el método más idóneo para la determinación de insecticidas clorados y fosforados. Como es sabido, en este método de análisis, los componentes se separan y distribuyen entre una fase estacionaria constituida por un líquido no volátil, y un gas móvil inerte, encontrándose la fase estacionaria sobre un soporte inerte sólido.

Este método, cuya sensibilidad varía con el tipo de detector, permite poner de manifiesto en ocasiones cantidades de pesticida del orden de picogramos, ha sido ampliamente descrito y utilizado.

BURKE y JOHNSON (78) usan la GLC con el detector microcolumétrico y determinan el tiem-

po de retención de 68 pesticidas con la columna rellena de grasa de silicona.

Otros autores investigan el uso de distintos detectores: detector de captura de electrones (79); de ionización de llama de hidrógeno (80); detector termoiónico (81), etc... así como el uso de diversas columnas (82).

Este último detector fué descubierto al ver que la adición de una sal de sodio a la llama de oxígeno e hidrógeno de un detector de ionización de llama de hidrógeno, mejoraba la corriente de ionización producida cuando un compuesto nitrogenado o fosforado entraba en la zona de la llama.

GIUFFRIDA y col. (83) estudian la aplicación conjunta de dos detectores, electrón captura y termoiónico, o de ionización de llama alcalina.

IVES y GUIFRIDA (84) investigan también la aplicación de este último detector para compuestos orgánicos conteniendo nitrógeno, arsénico o cloro, utilizando sales alcalinas adecuadas a cada caso.

En los métodos oficiales de Association of Official Analytical Chemists (85), recomiendan la utilización de este detector para la identificación y valoración de residuos de organofosforados.

La Food and Drug Administration (88) utiliza para la confirmación de residuos de DDT en presencia de PCB, el tratamiento con KOH alcohólica que produce el paso de pp'-DDT a pp'-DDE y deja inalterados los PCB's.

MILLS (89) transforma el pp'DDE en diclorobenzofenona por oxidación con ácido crómico, oxidación que no afecta tampoco a los PCB's.

Entre nosotros BOADO y col. (86) y SIMAL y col. (87), han utilizado estas pruebas en la confirmación de residuos de pesticidas y PCB en aguas y moluscos de la Ría de Arosa.

En cuanto a la confirmación de otros pesticidas como Aldrin y Dieldrin, NOREN (90), transforma el Aldrin en Dieldrín por epoxidación con peroxiacético.

WIENCKE y BURQUE (91), usando clorhídrico concentrado en etanol, transforman el Dieldrín en clorhidrina del Dieldrin por ruptura del grupo epóxido.

b).- Valor "p":

BEROZA y BOWMAN (92) proponen la determinación del 'valor "p" para la identificación de

BOADO y col. (86) y SIMAL y col. (87) en un estudio sobre residuos de pesticidas en aguas y mejillones de la Ría de Arosa utilizan esta técnica analítica.

2.3.1.1.- Técnicas de confirmación en GLC.- Muchas sustancias se comportan en GLC con igual tiempo de retención pudiendo no ser pesticidas. Para confirmar la presencia de estos, se hace necesaria la utilización de diversas técnicas de identificación y entre ellas, además de la separación sobre florisil que ya es en sí una prueba de confirmación, la utilización de distintas columnas y diferentes detectores en la GLC, así como la formación de derivados o transformaciones en la molécula mediante reacciones químicas o exposición a las radiaciones U.V., utilización de la técnica de espectrofotometría, etc.

a).- Pruebas químicas:

Las pruebas químicas pueden utilizarse asociadas a la GLC para transformar una sustancia, en otra cromatografiable con distinto tiempo de retención. En este sentido son especialmente útiles en la diferenciación entre pesticidas clorados y policlorobifenilos (PCB).

pesticidas y proporcionan con su trabajo una Tabla de dichos valores para 88 pesticidas en seis distintos pares de solventes, tabla que ha sido desde entonces incrementada por la contribución de diversos autores, y que además aparece incorporada a los métodos oficiales seguidos por la Food and Drug Administration (93).

c).- Radiaciones Ultravioleta:

Otro método de confirmación para pesticidas clorados es la utilización de luz U.V.

BANKS y BILLS (94) señalan la formación de productos de degradación típicos en ciertos insecticidas organoclorados con este tipo de radiación.

KAUFMAN y col. (95) utilizan este procedimiento, elaborando patrones de degradación para Aldrín, Dieldrín, pp'-DDE, op'-DDT, op'-DDE y heptaclor y obtienen buenos resultados en la diferenciación de pesticidas y otros coextractivos interferentes por su distinto comportamiento.

Los coextractivos más frecuentemente citados son los policlorobifenilos que producen numerosas interferencias en GLC incluso después de utilizar el florisil como método de purificación. Para solucionar este problema, además de reaccio

nes químicas como las ya citadas en 2.3.1.1., algunos investigadores como HANNAN y col. (96) han utilizado el procedimiento de irradiación con este objeto, obteniendo buenos resultados.

d).- Otras técnicas:

Además de las ya mencionadas aunque no de forma sistemática, hemos utilizado la TLC y la espectrofotometría de infrarrojos. Ambas técnicas, ya utilizadas en este Departamento por SAAVEDRA (97) y CREUS (98) y para identificación de pesticidas en formulaciones, o a nivel de mg.

2.3.2.- *Actividad anticolinesterásica:*

Como es sabido, los pesticidas organofosforados y carbamatos están sustituyendo en estos últimos años ampliamente a los organoclorados. La utilización de la GLC en su detección se hace insuficiente debido a que algunos de ellos son termolábiles pasando desapercibidos a este tipo de análisis.

Estos dos grupos de pesticidas tienen la propiedad común de inhibir la colinesterasa lo cual puede ser aprovechado para su detección.

GIAN y HALL (9) proponen esta técnica pa-

ra medida de los residuos de pesticidas inhibidores.

FALLSCHEER y COOK (100) demuestran que un importante número de organofosforados pueden convertirse *in vitro* en inhibidores de la colinesterasa merced a la acción oxidante del agua de Bromo, lo que parece aumentar la sensibilidad del método enzimático.

La ventaja por tanto de los métodos de medida de la inhibición de la colinesterasa es su amplio campo de utilización y una relativa alta sensibilidad. Además es particularmente apropiada cuando el insecticida sufre cambios en su estrutura con producción de metabolitos de alta actividad inhibidora. Una desventaja, sin embargo, es el carecer de especificidad para distinguir los diferentes inhibidores presentes en una muestra dada.

En la aplicación de esta técnica es necesario considerar los siguientes aspectos:

- A) Fuente de colinesterasa, elección de sustrato, y
- B) Método de valoración.

A).- Consideraciones en torno a la fuente de colinesterasa y substrato empleado:

En cuanto a la elección de la enzima, teniendo en cuenta que el poder inhibidor depende en gran manera de la fuente enzimática, se ha demostrado que algunos pesticidas inhiben en mayor proporción las colinesterasas del grupo I (colinesterasa que actúa específicamente sobre la acetil colina) y otros las del grupo II (colinesterasas no específicas de la acetil colina). Así se ha podido comprobar (101) que el sevin, por ejemplo, inhibe por igual la colinesterasa del plasma humano y de caballo (grupo II) que la de eritrocitos bovinos (Grupo I). El malatió, sin embargo, inhibe fuertemente la estearasa presente en los eritrocitos de algunas especies de mamíferos (colinesterasa del grupo I) pero es casi inefectiva su habilidad para inhibir la estearasa del suero bovino (colinesterasa del grupo II). De ello se deduce que la acetilcolina no puede considerarse como un substrato absoluto y si a esto unimos el que aún dentro de un mismo grupo de colinesterasas, no todas son igualmente inhibidas por un determinado pesticida, variando la afinidad, con la procedencia animal de la enzima, se hace compleja la elección.

En la literatura son mencionados el uso de hígado homogenizado de bovino (102) o hígado de conejo (103), extractos salinos de cabeza de abeja, (104), reactivos todos ellos en general de difícil obtención.

B).- Métodos propuestos en la literatura para la medida de la actividad colinesterásica:

Entre los muchos métodos que se han propuesto para la valoración de la actividad de la colinesterasa figuran:

a) Métodos de cambio de pH.- La colinesterasa se hace actuar sobre la acetilcolina en presencia de una solución buffer durante un período de tiempo de 1-2 horas y el cambio de pH durante un determinado tiempo (generalmente $\Delta \text{PH/hr}$) debido al acético liberado, es una medida de la actividad enzimática (105). MESTRES (106) utiliza este método en la búsqueda de insecticidas colinesterásicos en vinos.

b) Métodos volumétricos.- Se determina el ácido acético liberado, por titulación con lejía alcalina a pH constante. En esta valoración puede usarse un indicador ácido-base (107), u otro mé-

todo electrométrico, titulador conductimétrico o potenciométrico. La ventaja de este método sobre los de variación de pH es que la medida de la actividad no está directamente influenciada por la fuerza buffer de la solución siendo sin embargo el pH constante. Cuando este método es usado en técnicas microtitrimétricas se han obtenido muy buenas sensibilidades (108).

c) Métodos manométricos. - El primero, es descrito por AMMON (109). Es un procedimiento, que como los anteriores se basa en el ácido acético liberado. Aquí se mide manométricamente el anhídrido carbónico desprendido al reaccionar el ácido con una disolución de bicarbonato.

d) Métodos colorimétricos. - Unos se basan como los anteriores en el ácido acético liberado. Siguiendo este método BEGGS y col. (110) usan el azul de bromotimol para medir el cambio en la absorbancia experimentado por la producción de ácido acético.

Otros se fundan en la acetilcolina remanente después de la hidrólisis. HESTRIN (111) usa la hidroxilamina para reaccionar con la acetilcolina sobrante y formar ácido acetilhidroxámico, que en presencia de iones férrico forma un com-

plejo coloreado cuya intensidad se mide a 540 nm.

2.3.2.1.- Técnicas para identificación de pesticidas inhibidores de la colinesterasa:

Debido a la falta de especificidad del método anterior se hacen necesarias técnicas de identificación. En este sentido se ha visto:

a) Posibilidad de utilizar distintos enzimas.-

Los pesticidas no tienen igual especificidad por esterasas que procedan de distinta fuente.

Así se ha comprobado (112) que el iazinon, sevín, systox, tritition, phorate y otros presentan igual grado de inhibición frente al plasma de caballo que frente al humano, sin embargo el Malatión y el Paratión tienen una capacidad de inhibición mayor frente al plasma humano que frente al de caballo. De esto se deduce que el uso de ambos tipos de plasma serviría para diferenciar malatión de tritición o mejor todavía malatión de sevín u otro que no sea detectable en GLC.

PACK y col. (113) han usado un método similar para determinar pequeñas cantidades de Di-

rom en presencia de DDVP, usando plasma humano y colinesterasa cristalina purificada de eritrocitos bovinos. Por otra parte YU y col. (114) estudian la relación que puede tener la estructura molecular con la actividad anticolinesterasa y llega a la conclusión de que en los compuestos fenil N-alquil carbamatos, las sustituciones en N de cadena larga resultaban más inhibitoras cuando se usaba colinesterasa de eritrocitos de bovino mientras que las sustituciones de cadena corta presentaban mayor grado de inhibición sobre colinesterasa de insectos.

De todos modos, la ayuda que este procedimiento proporciona a la identificación no son suficientes y resultan de complicada interpretación.

b) Cromatografía en capa fina.- MENDOZA y col. (115) emplean la técnica de TLC-inhibición enzimática para determinación de carbamatos y fosforados averiguando los niveles de detección para varios de ellos frente a distintas esterasas.

MELVIN y STANLEY (116) han usado una técnica similar pero utilizando papel, en la identificación de fosforados.

MENDOZA y SHIELDS (117) estudian los factores que afectan a la sensibilidad y especificación de ambos tipos de pesticidas en este método de identificación y llega a la conclusión de que no solo afecta la fuente de estearasa sino también la dilución de esta y la oxidación del pesticida.

Dichos informes, si bien contribuyen a aumentar la sensibilidad en determinados casos, llevan a la conclusión de que no son eficaces en una identificación rápida de un problema desconocido. Lo mismo sucede con la utilización de diferentes enzimas, de aquí que se prefiera la utilización de distintos líquidos de desarrollo y el empleo de diferentes reactivos cromogénicos.

FISCHER (118) y FISCHER y PLUNGER (119) en la determinación de fosforados usan silicagel G y como líquido de desarrollo, cloroformo: acetona: n-hexano (1:1:1).

En este último sentido también RAMASANY (120) ha obtenido buenos resultados en la determinación conjunta de fosforados y carbamatos.

2.4.- Análisis cuantitativo:

Son dos los tipos de métodos a considerar en la valoración cuantitativa: los aplicables a GLC y los empleados en la determinación de la actividad anticolinesterásica.

2.4.1.- *Métodos de cálculo en GLC:*

La valoración cuantitativa de los resultados encontrados en la cromatografía de gases puede hacerse en función de los diferentes parámetros de los cromatogramas.

De los muchos métodos que se citan en la determinación cuantitativa de los pesticidas, casi todos ellos están basados en la determinación de la altura o del área de los picos producidos por soluciones standard que contienen los mismos componentes de la muestra.

En la determinación de la altura es necesario construir la línea base, buscar el centro del pico y trazar la vertical desde la zona centro de la base. Este es un método menos sujeto que otros al error del operador y recomendable sobre todo para picos estrechos, es decir los primeros del cromatograma. Varios autores sin em

bargo y entre ellos BURCHFIELD y STORRS (121) manifiestan que la altura es un parámetro muy sensible a cualquier variación en las condiciones de trabajo por lo que éstas han de ser estrechamente controladas cuando las medidas se hagan por este procedimiento.

Para picos anchos es recomendable hallar el área. SCOTT y GRANT (122) describen tres métodos:

- a) un método, el más general, válido para toda curva gaussiana consiste en considerar el área proporcional a la altura del pico multiplicada por la anchura en la semialtura. Este método no exige la construcción geométrica de la base prolongando la línea-base. Por tanto resultará altamente reproducible.
- b) En el método de triangulación se considera el área, proporcional a la altura por la mitad de la anchura en la base del pico. Este exige la construcción geométrica de un triángulo con la línea base y las tangentes por ambos lados a los puntos de inflexión. En este procedimiento la influencia de una mala línea base, es grande y además requiere un extremo cuidado en la construcción de las tangentes.

- c) El método planimétrico, semimecánico, consistente en medir las superficies de los picos con un planímetro, da las áreas reales. Tiene el inconveniente de no ser muy útil en un análisis de rutina.

BARRY y col. (123) en un estudio comparativo entre dichos métodos de triangulación, altura, altura por ancho del pico a la semialtura e integrador de disco, (siendo este un método mecánico cuyo fundamento es la transformación simultánea del desplazamiento de la aguja en un movimiento oscilatorio con una frecuencia tanto mayor cuanto más alta sea la desviación de la aguja), encuentran que por este último método se obtienen resultados superiores a los reales, careciendo los demás métodos de diferencias significativas.

Un problema que se presenta con frecuencia, es hallar el área de picos no resueltos. MUNNIK y FABRIE (124) aplican el método de la altura por el ancho a la semialtura. Cuando se puede construir un triángulo equilátero, aunque uno de sus lados sea casi imaginario, ambos parámetros quedan fijados. Cuando uno de los lados del triángulo, apenas se insinúa sobre otro triángulo mayor, la altura queda determinada por el segmento de perpendicular (siendo ésta trazada

de la cresta a la línea base) que queda comprendido entre el centro del pico y el lado imaginario del pico mayor. El ancho en la semialtura se puede calcular teniendo en cuenta el ancho del pico anterior y el del posterior al pico problema.

2.4.2.- *Métodos de cálculo de la actividad anticolinesterásica:*

La valoración cuantitativa de esta actividad viene determinada por el método de análisis elegido como puede verse en 2.3.2. (B)

llaman porcentaje de inhibición $\frac{DT_0 - D_1}{0,01 \cdot DT_0}$, siendo DT_0 y D_1 las variaciones de pH sufridas por testigo y muestra respectivamente durante un determinado tiempo.

variaciones de pH sufridas por testigo y muestra respectivamente durante un determinado tiempo.

En los métodos oficiales de Association of Official Analytical Chemistry (125), basado en la reacción colorimétrica de la acetilcolina remanente, con la hidroxilamina y el ión férrico, se determina el porcentaje de inhibición por la fórmula:

$$100 - 100 \cdot \frac{1,3 - B}{1,3 - C}$$

donde B y C son las absorbancias de la muestra y el blanco respectivamente, siendo 1,3 la absorbancia que produce el complejo coloreado de la acetilcolina sola en igual dilución que el problema y el testigo.

3.- PARTE EXPERIMENTAL

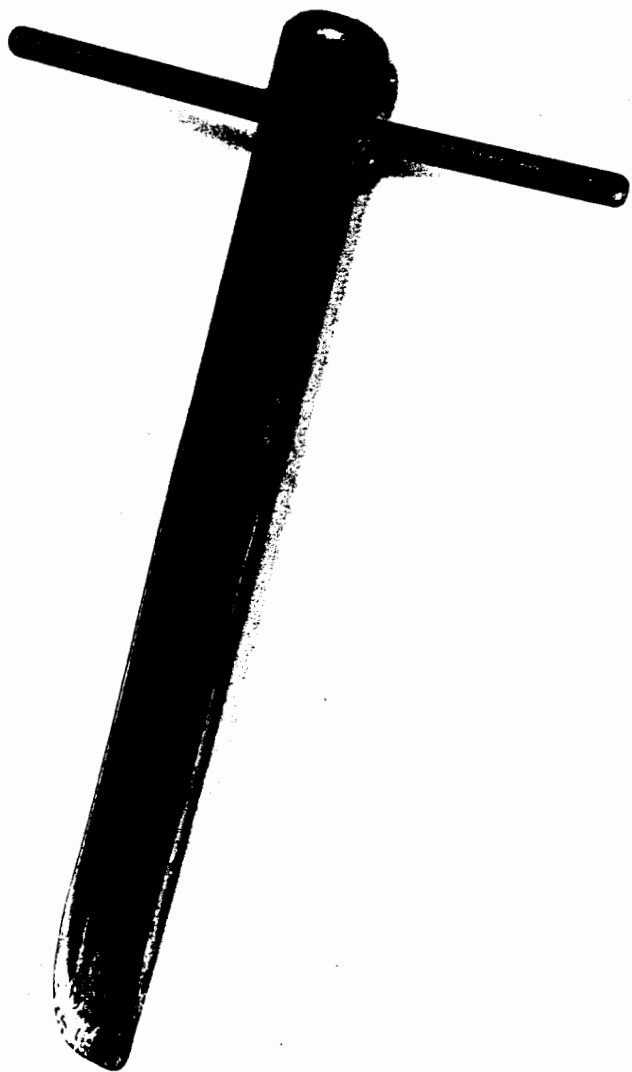
3.1.- APARATOS Y MATERIAL:

- Cromatógrafo de gases *Perkin-Elmer*: Modelo F-11, equipado con detector de captura de electrones (ECD), de electrodo concéntrico con fuente radiactiva de Ni-63; detector de ionización de llama de hidrógeno (FID), y detector termoiónico de cloruro potásico (KClTD) preparado con una modificación personal a partir del anterior.
- Registrador de doble canal, *Hitachi Perkin-Elmer*, Modelo 196.
- Dos amplificadores de ionización *Perkin-Elmer* para el modelo F-11, uno de ellos con el correspondiente accesorio para el control de voltaje, necesario al ECD.
- Estufa *Perkin-Elmer F-11 de Alta Performance*, con medidor de temperatura incor-

porado.

- Espectrofotómetro de infrarrojos *Perkin-Elmer*, Modelo 237 y accesorios para la elaboración de microcomprimidos.
- Combi-Titrator 3D *Metrohm Herisau*, compuesto de:
 - potenciómetro E 353 B
 - impulsomat E 473
 - dosimat de 1 cm³, E 412
 - electrodo combinado EA-121
 - registrador E 425
 - cubeta de valoración termostatizada EA 880-20
- Ultratermostato HAAKE, tipo NBS
- Rotavapor *Buchi* para concentraciones a presión reducida.
- Lámparas de ultravioleta de 254 y 360 nm
- Molino de percusión *Culatti* para vegetales.
- Homogenizadora *multi-bat*

- Dispositivo para toma de muestra del sue
lo. Fig. 1.
- Centrífuga *Christ*.
- Embudos de decantación de 1.000 cm^3 pro-
vistos de llave de teflón.
- Evaporador concentrador tipo Kuderna-Da-
nish con tubos acoplables de 5 cm^3 , cons-
truídos por afora con referencias, evapo-
rador y tubo, V-17442 y V-17443 respecti-
vamente.
- Columnas de cromatografía de 20×400
mm. con placa filtrante para la purifica-
ción del SO_4Na_2 .
- Columnas de cromatografía de 14×200 mm.
para purificación del extracto.
- Columnas de vidrio para la cromatografía
de gases de 3 mm. de diámetro interno y 2
m. de longitud rellenas con a) DC-200 al
10% en peso sobre Gas-chrom Q de 100/120
mallas y b) DC-200 al 10% en peso + QF-1
al 15% en peso sobre Gas-Chrom Q 100-120
mallas.



- Microjeringas Hamilton de 10 microlitos y aguja acoplada, ref. 701N.
- Células de cuarzo de 1 cm de espesor, como las utilizadas en espectrofotometría de ultravioleta.
- Cromatofolios-Al: óxido de aluminio F254 neutro (tipo E) 20 x 20 cm. Espesor de capa: 0,20 mm. Casa Merck Art. núm. 5550
- Pipetas automáticas de 2 y 5 μ l.
- Pulverizadores.
- Tanques cromatográficos.
- Columnas de rectificación Snyder de 20 cm.
- Nitrógeno N-47 (S.E.O.)
- Envases de gases: Hidrógeno N-39 (S.E.O.)
Aire comprimido (compresor).
- Otro material de uso corriente en laboratorios de investigación.

3.2.- REACTIVOS:

Consideraciones generales:

Los disolventes y otros reactivos usados en el análisis de residuos de pesticidas tienen que estar libres de sustancias que causen degradación, adsorción del pesticida y en general interferencias en sus etapas de identificación y valoración. Para investigar la posible presencia de sustancias interferentes hemos empleado el método seguido por la FDA (35) concentrando 300 cm³ de disolvente a ensayar en un Kuderna-Danish hasta 5 cm³ e inyectando 5 µl del concentrado en el cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones. En las condiciones de trabajo, no debe producir un pico mayor de 1 mm. en la línea base durante 2-60 minutos después de la inyección para que el disolvente se considere libre de sustancias interferentes. Para investigar la posible presencia de sustancias que pueden degradar los pesticidas aún cuando no produzcan interferencias, se somete al proceso total de análisis cantidades conocidas de organoclorados y organofosforados en ausencia de muestra (los solventes con oxidantes son causantes de degradaciones notables sobre todo en fosforados y especialmente en el carbofenotión).

La purificación de reactivos, llevada a cabo para eliminar estas impurezas, han sido distintas y son mencionadas en cada caso.

Reactivos empleados:

- Acetonitrilo: Fluka, de p.e = 79-82°C
- Eter de petróleo: CAMPSA de p.e. 30-60°C purificado por redestilación con columna Snyder a pesar de lo cual no se eliminan algunas impurezas como hemos podido comprobar.
- Agua bidestilada en presencia de permanganato potásico para eliminar la materia orgánica e interferencias en análisis por cromatografía gaseosa (126).
- Cloruro sódico.
- Sulfato sódico anhidro para deshidratación de los extractos previamente purificados por lavado con eter de petróleo y posterior desecación en estufa a 180°C durante 12 horas..
- Eter etílico Abelló, purificado por destilación en presencia de sodio metálico para eliminar

nación de peróxidos. Para comprobar esta circunstancia, se añaden a 10 cm³ del destilado, 1 cm³ de solución de IK al 10% (p/v) recién preparada, no debiendo observarse el color del yodo en ninguna de las dos capas formadas; en caso contrario, la purificación no habrá sido efectiva.

- Florisil Fluka de 60-100 mallas, activado como se indica en 3.6.
- Acido láurico.
- Disolución alcohólica de fenolftaleina al 1%.
- Hidróxido sódico para preparación de solución 0,1N, utilizada en la determinación del índice de ácido láurico y de la actividad enzimática.
- Cloruro potásico para la preparación del detector termoiónico de cloruro potásico (KC1TD) y BrK para los microcomprimidos de espectrofotometría de IR.
- Hidróxido potásico.
- Alcohol metílico.

- Anhídrido crómico
- Acido acético glacial
- Benceno redestilado
- Peróxido de hidrógeno al 30% (p/p)
- Acido sulfúrico
- Bisulfato sódico
- Carbonato sódico
- Cloruro de zinc anhidro
- Acido clorhídrico cocentrado
- Etanol absoluto
- n-hexano
- Diclorometano.
- Solución de polietilenglicol-400 al 1% (v/v) en diclorometano.
- Plasma de caballo, obtenido de sangre recién

recogida sobre heparina (0,2 mg/100 cm³), en el matadero municipal y centrifugada a 2.500 rpm durante 30-45 minutos.

- Acetilcolina
- Líquidos de desarrollo para la cromatografía en capa fina: acetona, n-hexano y cloroformo
- Nitrato de plata
- Monoetanolamina

Todos estos productos utilizados fueron de la casa Merck, a excepción de aquellos en los que se indica su procedencia.

- Solución patrón de pesticidas organoclorados y fosforados empleada en el estudio de la recuperación del proceso de purificación y en la puesta a punto del detector termoiónico de clororuo potásico.

Heptaclor	0,12	ppm
Malation	1,20	"
Heptaclor-epóxido	0,20	"
Dieldrín	0,28	"
Etion	0,80	"
Triton	1,40	"

3.3.- MUESTRAS:

Las muestras objeto de estudio son: tierra del suelo de una parcela recogida periódicamente a lo largo de cinco años y sus diferentes cultivos: patatas, maíz, grelos, repollo y alubias.

3.3.1.- Toma de muestras:

Para el muestreo del suelo, se ha utilizado un toma muestras usual en este tipo de análisis (Fig. 1), que permite obtener una muestra representativa del suelo de hasta unos 20 cm. de profundidad. Por otro lado, de los diferentes productos recolectados, se ha utilizado la parte comestible.

3.3.2.- Conservación de las muestras:

Las muestras fueron guardadas en nevera y bolsas de polietileno, a fin de garantizar el mantenimiento de la humedad y el contenido en pesticidas hasta el comienzo del análisis en las 24 horas siguientes, dando preferencia a las muestras de grelos, repollo y patatas, y dentro del proceso analítico, a la extracción y análisis de organofosforados.

Las muestras de suelo sobrantes, fueron secadas al aire y luego guardadas en bolsas de polietileno con el objeto del mejor mantenimiento de pesticidas (51), para posibles repeticiones de análisis.

Es de destacar que la naturaleza de las bolsas es de suma importancia debido a su variada composición y su posible contenido en policlorobifenilos (PCB's) como sustancias plastificantes. Por ello hemos llevado un control de las bolsas de almacenaje mediante espectrofotometría de I.R. en el que obtuvimos en la mayoría de los casos (fig. 2b y 2c) la estructura del polietileno de la fig. 2a, reproducida de Perkin-Elmer Infrared Applications Study (127).

Sin embargo, la obtención de cromatogramas muy distintos (Fig. 3a y 3b) para diferentes tierras, nos ha hecho pensar en la cesión por algunos plásticos de sustancias que podrían ser de la naturaleza de los PCB's composición que se puede comprobar (fig. 3a) por las pruebas químicas de estas sustancias (véase más adelante 3.7.6.7.e).

Tanto aquellas muestras que presentaban PCB's, como aquellas en las que no sucedía esto, estaban contenidas en bolsas cuyos espectros res

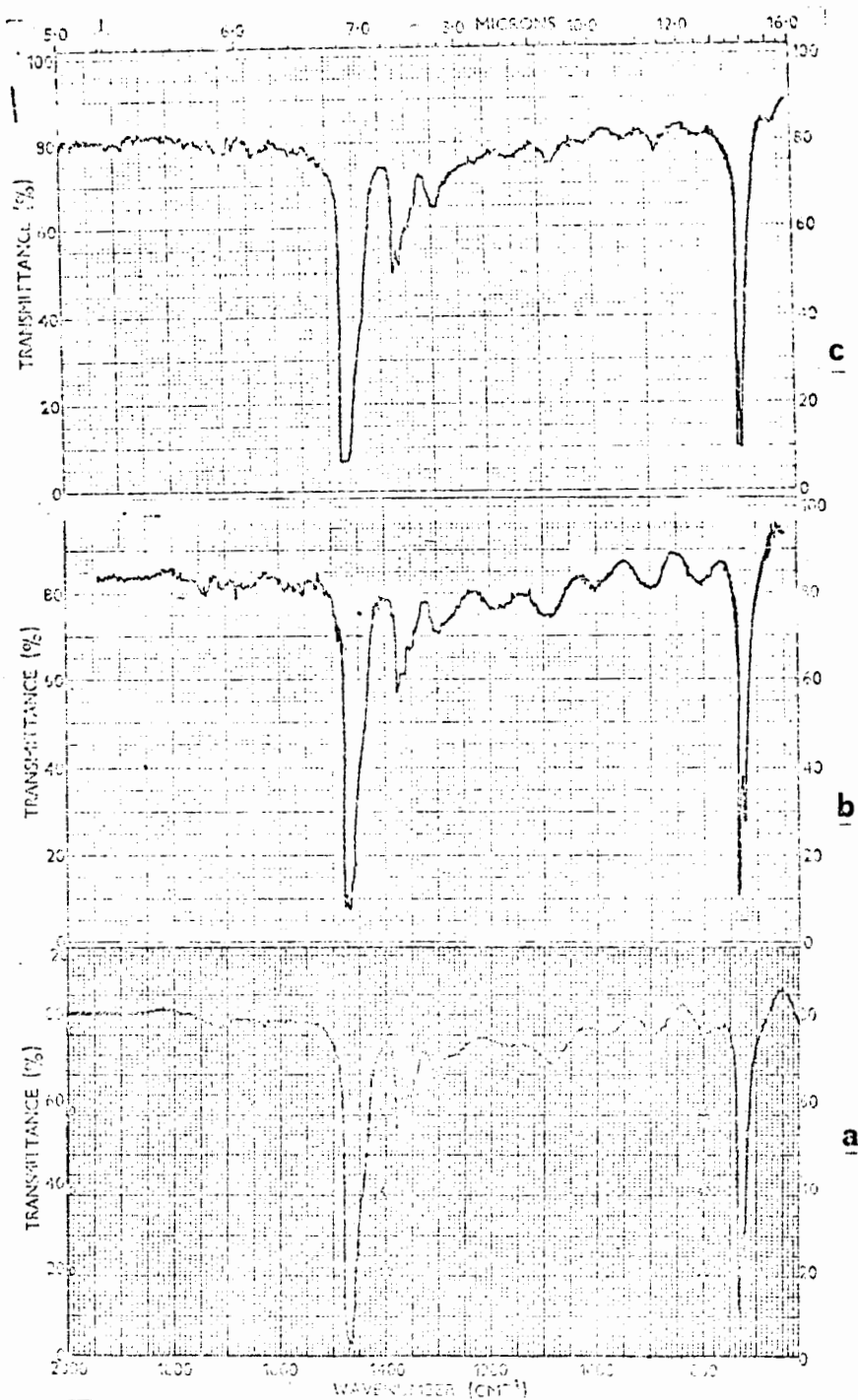


FIGURA 2.- a) Espectro de polietileno
 b) y c) Espectros de las bolsas empleadas
 en el almacenaje.

ponden a los de la fig. 2. Sometiendo las bolsas a un proceso analítico igual al de las muestras, se pone de relieve por GLC la existenciá de dos plásticos diferentes (fig. 4a y 4b) responsables de los cromatogramas del suelo 3a y 3b respectivamente.

Por otra parte se ha comprobado que en aquellas bolsas de plástico con cromatograma 4a, no había cesión a lo largo del tiempo de ningún componente interferente en GLC (fig. 5a y 5b) y ello no obstante haber en estos cromatogramas de plásticos pequeñas cantidades de sustancias (fig. 5c)

3.3.3.- Localización y descripción de la parcela de terreno objeto de estudio:

Está situada en la provincia de LA CORUÑA en el municipio del Valle del Dubra, lugar de Niveiro (*), con una orientación que puede observarse en la figura 6.

La dimensión aproximada de la parcela utilizada es de unos 10.000 m², terreno llano y con una pendiente de un 3% hacia el sur. El terreno

(*).- *Aprovechamos estas líneas para agradecer a su propietario D. Julio Gándara Nión, la autorización y facilidades dadas en la recogida de muestras.*

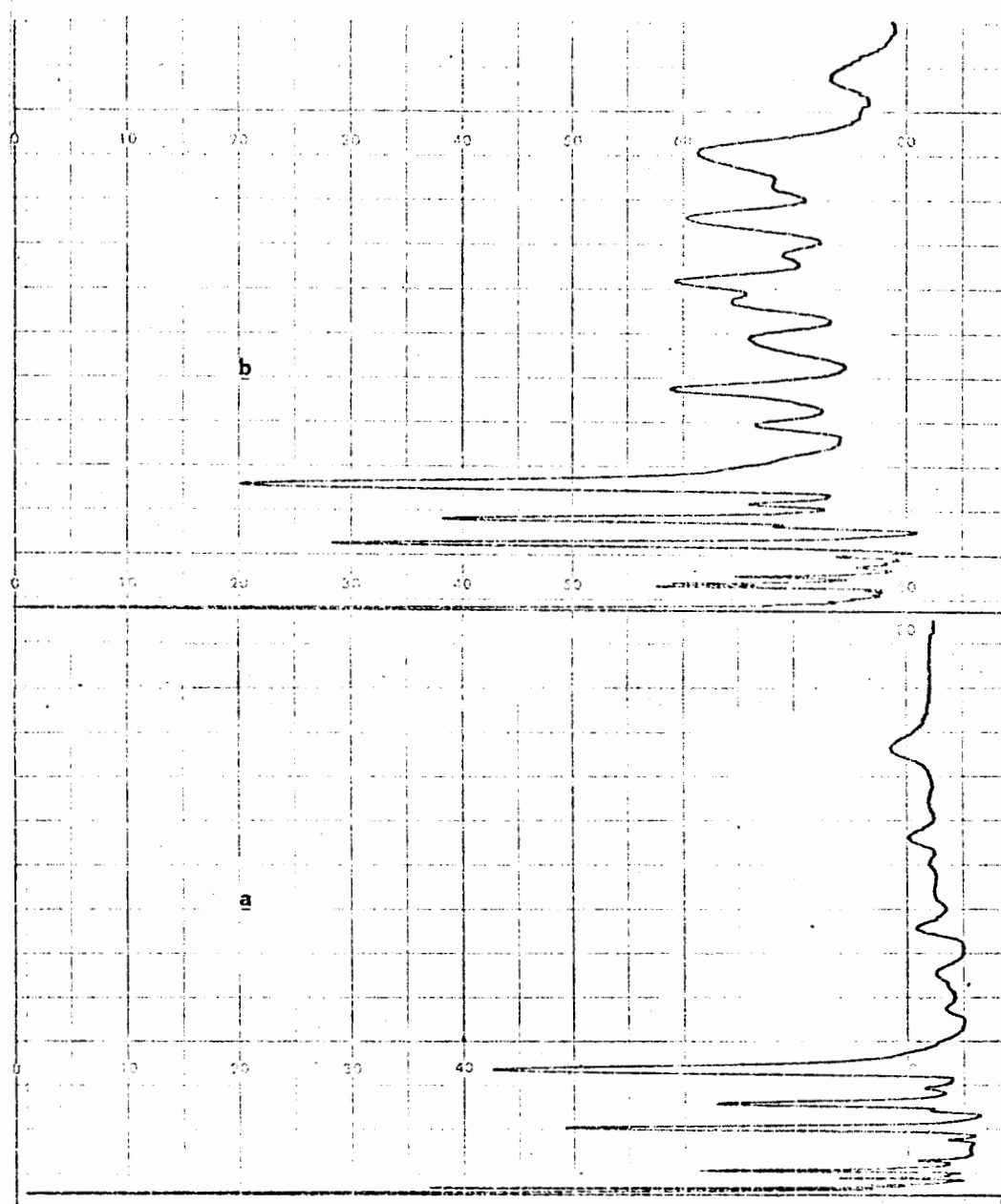


FIGURA 4.- a) Cromatograma de un extracto de plástico con pocas interferencias.
b) Cromatograma de un extracto de plástico con interferencias

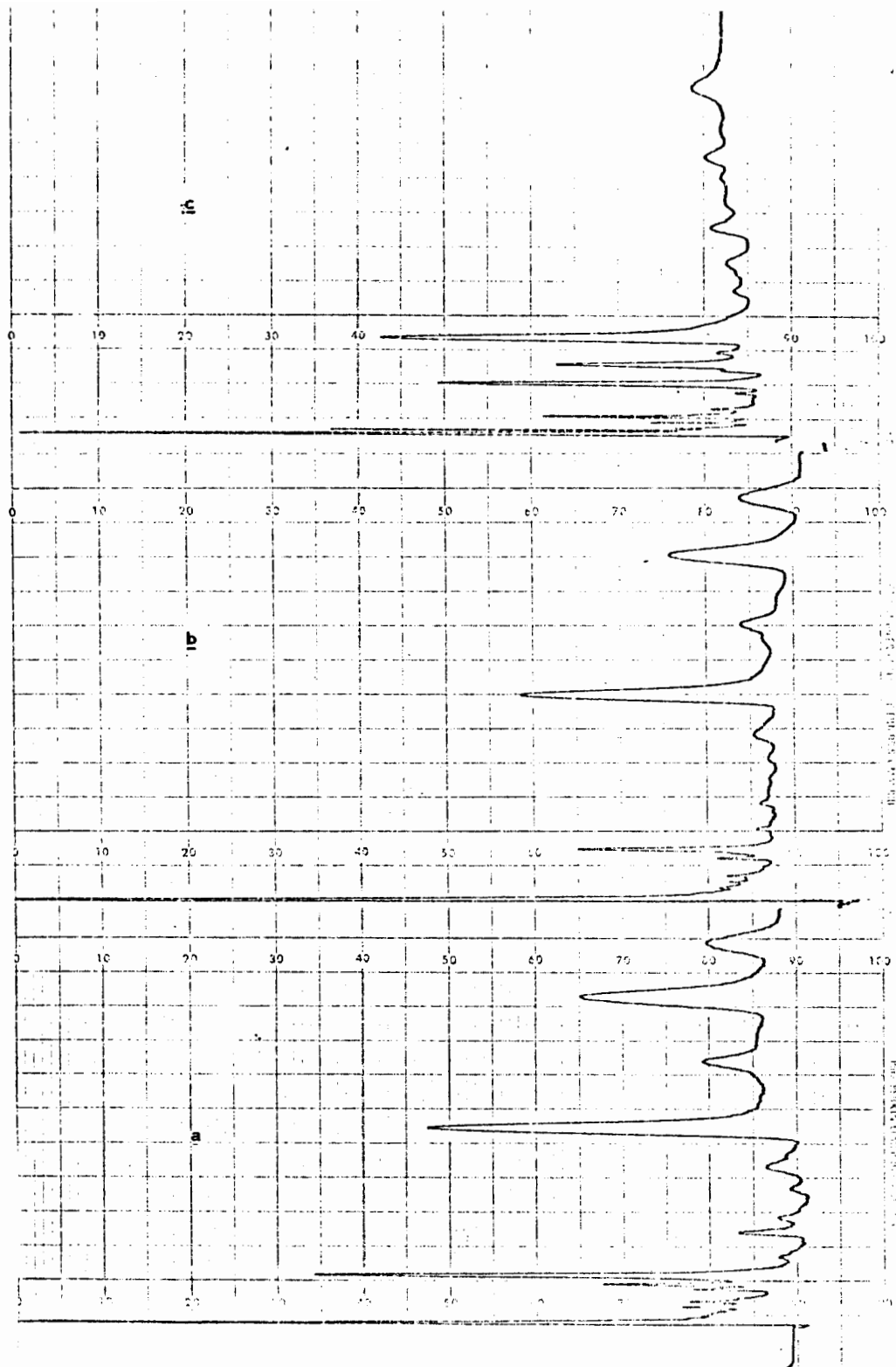


FIGURA 5.- a) Cromatograma de SA-6-73 correspondiente a un extracto obtenido en 6-75.
 b) Cromatograma de SA-6-73 correspondiente a un extracto obtenido en 6-75.
 c) Cromatograma de un extracto de la bolsa de SA-6-73.

es trabajado con tractor y regado exclusivamente por las lluvias.

Las muestras de suelo pertenecen a puntos arbitrarios agrupados en las zonas A y B del esquema de la fig. 6. Ambas zonas con textura y estrutura análogas cuya composición y características se detallan en el cuadro I.

Las muestras de los productos recolectados han sido tomadas de diferentes zonas de la parcela por cambiar la situación del cultivo rotatorio. En ocasiones, al ser sembrados granos de maíz tratados, muestras M-5-71, M-5-72 y M-5-73, se ha determinado su contenido en pesticidas a fin de establecer la posible presencia de algunos residuos incorporados al suelo y/o a los productos recolectados.

Los cultivos realizados durante el tiempo del estudio así como la proporción de superficie aproximada empleada para cada cosecha, la situación con respecto a las zonas A y B, y las aplicaciones de pesticidas que han tenido lugar, se han representado en la fig. 7. En cada uno de los esquemas se distingue la zona cultivada en blanco, en tanto que se ha rayado la zona de descanso.

Finalmente, para referirnos abreviadamente

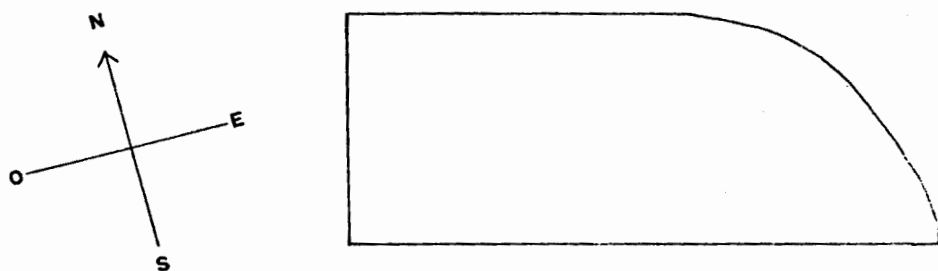


FIGURA 6.- Orientación de la parcela

TEXTURA, ESTRUCTURA Y COMPOSICION QUIMICA DEL SUELO OBJETO DE ESTUDIO

pH (H₂O) ----- 5,00
pH (ClK) ----- 4,50

Granulometría:

Arcilla ----- 19,75%
Limo ----- 20,66%
Ar. fina ----- 43,81%
Ar. gruesa ----- 15,88%

Textura ----- A-L

Carbono ----- 2,50%
M. orgánica ----- 4,34%
Nitrógeno ----- 0,18%
C/N ----- 14,0%

Cationes de cambio:

H⁺ ----- 19,39 meq/100 g.
Ca⁺⁺ ----- 8,0 " "
Mg⁺⁺ ----- 10,78 " "
Na⁺ ----- 3,70 " "
K⁺ ----- 3,51 " "

Grado de saturación = 57,27%

Capacidad total de cambio T = 45,38 (meq./100 g)

CUADRO I

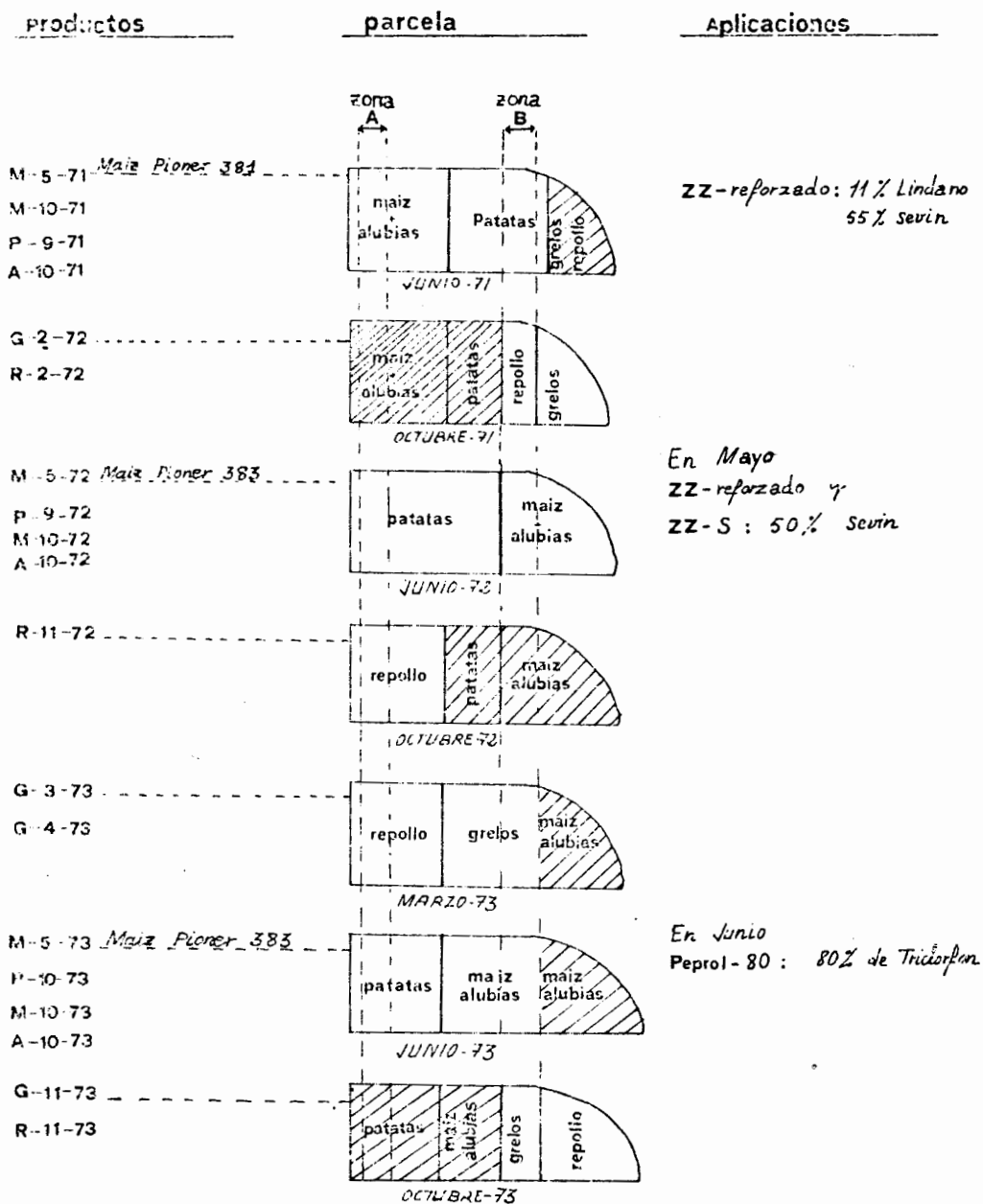


FIGURA 7.- Situación en la parcela de los productos recolectados y pulverizaciones que tuvieron lugar.

a las muestras de suelos, las hemos designado con la inicial de su nombre (S), seguida de la letra A o B, según que corresponda a una u otra zona de muestreo y de números correspondientes a la fecha de recogida, vease cuadro II.

En las muestras de los productos agrícolas recolectados en la parcela a lo largo de este tiempo, análogamente se les asignó la letra inicial de su nombre seguida de la fecha de recogida, vease esta asignación en el cuadro II y en la fig. 7.

3.3.4.- Preparación de las muestras:

En todos los casos ha sido necesaria una preparación previa de la muestra:

Suelos: fueron sometidos a tamización con una abertura de 0,1 mm. de luz al objeto de separar piedras, hierbas, etc.

Patatas: después de privadas de la piel fueron dislaceradas en una homogenizadora Multi-bat.

CUADRO II

NOMENCLATURA UTILIZADA PARA LAS MUESTRAS

FECHAS	SUELOS		GRELOS	REPOLLO	PATATAS	MAIZ	ALUBIAS
20-5-71						M-8-71	
15-9-71					P-9-71		
15-10-71						M-10-71	A-10-71
15-2-72	SA-2-72	SB-2-72	G-2-72	R-2-72			
24-3-72	SA-3-72	SB-3-72					
23-4-72	SA-4-72	SB-4-72					
25-5-72	SA-5-72	SB-5-72				M-5-72	
24-6-72	SA-6-72	SB-6-72					
17-9-72	SA-9-72	SB-9-72			P-9-72		
14-10-72	SA-10-72	SB-10-72				M-10-72	A-10-72
18-11-72	SA-11-72	SB-11-72		R-11-72			
21-12-72	SA-12-72	SB-12-72					
5-3-73	SA-3-73	SB-3-73	G-3-73				
2-4-73	SA-4-73	SB-4-73	G-4-73				
6-5-73	SA-5-73	SB-5-73				M-5-73	
17-6-7	SA-6-73	SB-6-73					
8-7-73	SA-7-73	SB-7-73					
6-10-73	SA-10-73	SB-10-73			P-10-73	M-10-73	A-10-73
10-11-73	SA-11-73	SB-11-73	G-11-73	R-11-73			
21-12-73	SA-12-73	SB-12-73					
26- 2-74	SA-2-74	SB-2-74					
5-10-74	SA-10-74	SB-10-74		R-10-74	P-10-74	M-10-74	A-10-74
7-1-75		SB-11-74	G-11-74				
22-4-75	SA-4-75	SB-4-75					

Maiz: se toma una muestra representativa despues de ser triturado en molino de percusión y pasado por un tamiz de 1 mm. de luz.

Grelos y repollo: después de cortados finamente, fueron dislacerados al igual que las patatas.

En todas las muestras se ha determinado la humedad por desecación con el objeto de elegir el proceso de extracción adecuado en cada caso y también a fín de conseguir una expresión constante del resultado en materia seca (cuadro III).

3.4.- ORGANIGRAMA del proceso analítico seguido:

Con objeto de apreciar de forma inequívoca los residuos de los más diversos pesticidas, se ha seguido el proceso indicado en la figura 8.

3.5.- EXTRACCION:

Elección de solventes y estudio de la recuperación.

En esta etapa del análisis de residuos, como es lógico, ha sido nuestro propósito emplear un disolvente eficaz para un mayor número de pes-

CONTENIDO EN AGUA DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS

SUELO	HUMEDAD (%)	MATERIA SECA (%)	SUELO	HUMEDAD (%)	MATERIA SECA (%)	PRODUCTOS RECOLECTADOS	HUMEDAD (%)	MATERIA SECA (%)
SA-2-72	24,20	75,8	SB-2-72	25,23	74,77	M-5-71	13,83	86,17
SA-3-72	27,00	73,0	SB-3-72	28,21	71,79	P-9-71	79,07	20,93
SA-4-72	25,81	74,9	SB-4-72	25,72	74,38	M-10-71	15,42	84,58
SA-5-72	19,73	80,37	SB-5-72	22,11	77,89	A-10-71	10,50	89,5
SA-6-72	20,15	79,85	SB-6-72	19,80	80,2	G-2-72	91,17	8,83
SA-9-72	16,40	83,6	SB-9-72	18,21	81,79	R-2-72	91,9	8,1
SA-10-72	24,60	75,4	SB-10-72	21,70	78,3	M-5-72	12,09	87,91
SA-11-72	26,20	73,8	SB-11-72	27,20	72,8	P-9-72	74,41	25,59
SA-12-72	22,00	78,0	SB-12-72	23,08	76,92	M-10-72	16,31	83,69
SA-3-73	27,50	72,5	SB-3-73	28,50	71,5	A-10-72	12,2	87,8
SA-4-73	26,20	73,8	SB-4-73	26,5	73,5	R-11-72	92,08	7,92
SA-5-73	28,10	71,9	SB-5-73	26,80	73,2	G-3-73	90,93	9,07
SA-6-73	20,60	79,4	SB-6-73	21,02	79,98	G-4-73	88,79	11,21
SA-7-73	21,62	78,38	SB-7-73	21,50	78,5	M-5-73	13,15	86,85
SA-10-73	24,33	75,67	SB-10-73	22,57	77,43	M-10-73	16,08	83,92
SA-11-73	26,28	73,72	SB-11-73	27,03	72,97	P-10-73	73,98	26,02
SA-12-73	22,00	78,00	SB-12-73	20,0	80,0	A-10-73	11,02	88,98
SA-2-74	23,80	76,2	SB-2-74	22,10	77,9	R-11-73	91,6	8,4
SA-4-74	27,7	72,3	SB-10-74	22,00	78,00	G-11-73	90,8	9,2
SA-10-75	26,2	73,8	SB-4-75	24,80	75,20	R-10-74	92,10	7,90
						P-10-74	75,22	24,78
						M-10-74	13,41	86,59
						A-10-74	11,03	88,97
						G-11-74	90,11	9,89

CUADRO III

ORGANIGRAMA

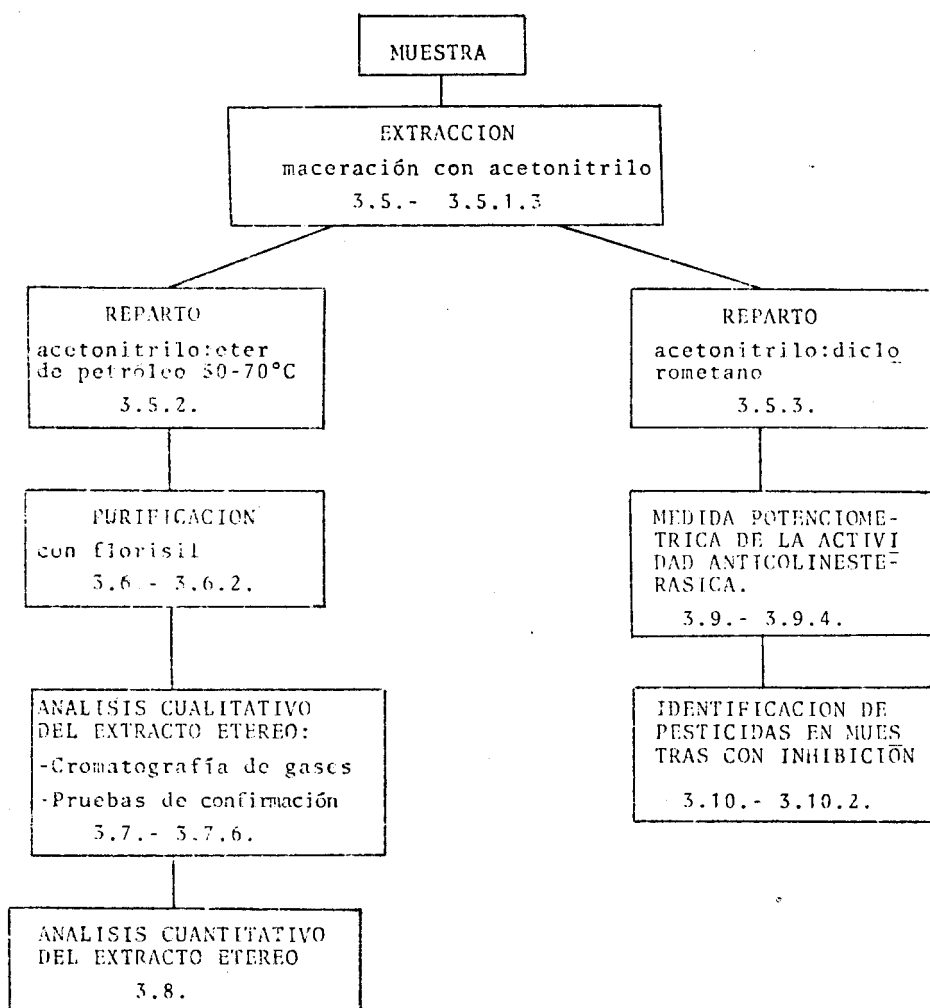


FIGURA 8

ticidas a la vez que válido para los distintos tipos de muestras y en este sentido hemos optado por el acetonitrilo, disolvente común en el análisis de los residuos procedentes de las distintas muestras.

En las muestras de los productos recolectados en la parcela se han seguido los métodos oficiales de la AOAC (1.970) (45) para productos no grasos ya que ninguna de las muestras sobrepasa el 4% de grasa, y cambios en los métodos oficiales de la AOAC (128) para aquellos productos secos o de bajo contenido en agua. El disolvente utilizado es el acetonitrilo o acetonitrilo-agua, dependiendo del contenido en agua de la muestra.

En cuanto a los pesticidas procedentes del suelo, se ha seguido en lo fundamental el mismo método anterior pero con la introducción de variantes de acuerdo con la bibliografía ya anteriormente citada (51) y (54).

El líquido orgánico procedente de esta primera fase de la extracción, se divide en dos volúmenes iguales para someterlos a las etapas 3.5.2. y 3.5.3. Con el primero, se pretende hacer el análisis por cromatografía de gases y se continúa para ello la extracción por el método oficial antes citado. Con el segundo se pretende determi-

nar la actividad anticolinesterásica por no ser la GLC suficiente ya que pesticidas como dipterex y carbaril contenidos en las pulverizaciones aplicadas en la parcela, objeto de este estudio, no son detectados. Para ello, esta segunda mitad del extracto, se somete a partición con cloruro de metileno, selección hecha por los siguientes motivos:

- 1.- Es un buen disolvente para los dos grupos de pesticidas citados, carbamatos y fosforados (45), (49) y (50) y da buenos resultados de recuperación en el reparto con acetonitrilo.
- 2.- Disponer de un proceso más para eliminar sustancias interferentes, y
- 3.- El tener los residuos disueltos en un disolvente mucho más volátil que el acetonitrilo, lo que es una ventaja para la obtención del residuo seco necesario en la determinación de la actividad anticolinesterásica.

Para la elección de estos métodos de extracción se ha llevado a cabo un sondeo de la recuperación para todo tipo de muestras en la obtención del extracto de diclorometano, y la recuperación en la obtención del extracto etéreo, solo para

las muestras de suelo por estar en las demás suficientemente estudiado.

Para ello se toma la muestra preparada como se ha indicado, se sobrecarga con una cantidad de disolución patrón y después de eliminar por concentración a vacío el disolvente, se procede a su extracción siguiendo los métodos elegidos.

Se han hecho por duplicado para cada 50 g. de muestra cargadas con distintas cantidades de pesticidas y los correspondientes ensayos en blanco. Las disoluciones patrón empleadas para los organoclorados fué:

Lindano	0,05 p.p.m.
Heptaclor	0,05 "
Aldrín	0,1 "
Dieldrín	0,15 "
Endrín	0,15 "

Los resultados encontrados pueden verse en el cuadro IV.

Análogamente se ha efectuado un estudio de la recuperación mediante la técnica de la colinesterasa (véase el capítulo correspondiente 3.9) empleando una disolución de

Dipterex... ..	50 p.p.m.
Sevin	20 "

RECUPERACION DE LOS PESTICIDAS ORGANOCLORADOS PROCEDENTES
DEL SUELO

PESTI- CIDA.	µg AÑADIDOS POR Kg.	µg RECUPERADOS POR Kg.	ECUACION DE LA RECTA.	RECUPERACION MEDIA (%).
LINDANO	1	0,80	$y=0,7350 x+ 0,155$	73,5
	2	1,67		
	0	0,20		
HEPTACLOR	1	0,67	$y=0,7500 x- 0,0265$	75
	2	1,5		
	0	0		
ALDRIN	2	1,45	$y=0,7750 x- 0,0333$	77,5
	4	3,10		
	0	0		
DIELDRIN	3	2,35	$y=0,8333 x- 0,0549$	83,8
	6	5,03		
	0	0		
ENDRIN	3	2,20	$y=0,7333 x- 0,0665$	73,5
	6	4,40		
	0	0		

CUADRO IV

3.5.1.- Maceración con acetonitrilo:

La maceración y agitación con el ácetonitrilo para los distintos tipos de muestra, tiene lugar de la siguiente forma:

3.5.1.1.- Muestras con humedad superior al 75%: patatas, repollo y grelos.

100 g. de la muestra preparada como se señaló anteriormente, se agitan mecánicamente con 200 cm^3 de acetonitrilo durante dos minutos. Seguidamente, se filtran por algodón a una probeta de 500 cm^3 . La muestra se extrae dos veces más con porciones de 50 cm^3 de acetonitrilo cada una, filtrándolas a su vez para la probeta. El extracto total se divide en dos partes iguales, una para GLC con la que se continúa como en 3.5.2., y otra para la determinación de la actividad anticolinesterásica con la que se sigue como en 3.5.3.

3.5.1.2.- Muestras con humedad inferior al 75%: maiz, alubias.

50 g. de la muestra debidamente preparada, se agitan con 200 cm^3 de acetonitrilo con un 35% de agua, durante 10 minutos. Se filtra el extracto para una probeta de 500 cm^3 , y se extrae la

muestra tres veces más con porciones de 50 cm^3 del acetonitrilo-agua. Reunidas todas las porciones, se divide el extracto en dos volúmenes iguales para continuar la extracción en los procesos 3.5.2. y 3.5.3.

3.5.1.3.- Suelos: A una muestra de 50 g. de tierra sin piedra, y conservando su humedad, se añaden 5 cm^3 de agua y se mezclan bien para que se humedezca uniformemente (en caso de tierras secas se han añadido hasta 15 cm^3 de agua). A continuación se agita mecánicamente con 200 cm^3 de acetonitrilo durante dos horas. Se filtra por papel Watman n° 4, a una probeta de 500 cm^3 . El suelo se humedece de nuevo con otros 5 cm^3 de agua y se agita una vez mas con 50 cm^3 de acetonitrilo durante media hora, operación que se repite otras dos veces, recogién dose todos los filtrados en la probeta. El volumen total se divide en dos porciones iguales para seguir la extracción en 3.5.2. y 3.5.3.

3.5.2.- Reparto en acetonitrilo-eter de petróleo:

La mitad del extracto destinada a GLC se pasa para una ampolla en la que previamente hemos colocado 600 cm^3 de agua bidestilada con un 2% de ClNa y 100 cm^3 de eter de petróleo purificado. Se agita fuertemente durante uno o dos minutos, y una vez separadas las fases se retira la capa acuosa y se extrae dos veces más con 50 cm^3 de eter cada una. Los líquidos etéreos se reunen y se lavan dos veces con 100 cm^3 de agua bidestilada cada vez. Posteriormente se desecan con sulfato sódico y se concentran en el evaporador-concentrador tipo Kuderna-Danish, hasta un volumen conocido. En este volumen, que luego va a ser sometido a purificación con florisil, queda representada la mitad de la muestra.

3.5.3.- Reparto en acetonitrilo:diclorometano:

La mitad del extracto de acetonitrilo-agua, destinado a esta etapa, se pasa a una ampolla de separación de litro en la que previamente se han puesto 600 cm^3 de agua destilada con 2% de ClNa y 100 cm^3 de diclorometano. Se agita y se separa la capa inferior, extrayendo el acetonitrilo-agua, otras dos veces más con 60 y 20 cm^3 de dicloromene

tano. Los líquidos de este disolvente reunidos, se desecan con 10 g. de SO_4Na_2 anhidro y después de añadirles 1 cm^3 de polietilenglicol al 1% en diclorometano, se concentran a vacío en un baño a 30-40°C hasta 25 cm^3 .

3.6.- PURIFICACION DEL EXTRACTO ETereo: Procedimiento.

Además de la partición a que se ha sometido el extracto hasta ahora, que de por sí es una forma de purificación del mismo, y aún cuando el contenido en ceras y otros *coextractivos* en la mayoría de las muestras era bajo, se han purificado todos los extractos mediante cromatografía en columna de Florisil (cromatografía líquido-sólido), técnica de purificación y separación previa al análisis propiamente dicho mediante cromatografía gaseosa.

En una primera etapa de este trabajo, siguiendo el método de MILLS y col. (34) oficial en los métodos de la AOAC (45) y (77) y usado, también por la FDA (35), hemos utilizado para la purificación florisil activado a 180°C durante 48 horas y conservado en desecador. Con este florisil se rellena una columna de cromatografía de

20 x 400 mm. provista de placa filtrante hasta 10 cm. de altura de florisil y 2 cm. de sulfato sódico en su parte superior. La columna se impregna de eter de petróleo haciendo pasar a través de ella 50 cm³ del mismo.

A continuación, cuando el nivel de disolvente este próximo a la parte superior del adsorbente, se vierte el extracto, concentrado a poco volumen, mediante una pipeta, procurando quede dispuesto en una delgada capa a modo de un disco. Se lava repetidas veces con poco volumen de líquido el tubo Kuderna donde se efectuó la concentración y la pipeta empleada y se pasan igualmente a la columna, en poco tiempo, evitando que la columna quede sin líquido en su extremo superior y que este volumen no constituya una zona ancha que perjudicaría a la resolución.

Como eluyentes hemos utilizado; en una 1ª fase, 200 cm³ de la mezcla eter-sulfúrico-eter de petróleo (6 + 94) v/v. en los que podrá encontrarse lindano, heptaclor, DDD, DDE, DDT, etc. Al finalizar aquel volumen se pasan otros 200 cm³ esta vez de la mezcla eter sulfúrico-eter de petróleo (15 + 85) v/v, que conseguirá arrastrar aquellos otros pesticidas más polares dieldrín, endrín, malatién, etc. Ambos eluatos se concen-

tran de nuevo, por separado, en un aparato Kuderna, hasta un volumen conveniente, en general de 1 a 5 cm³.

Hacia la mitad del estudio que estamos presentando, hubo necesidad de adquirir nuevamente Florisil, y al ensayar sus características fueron inadecuadas a la distribución antes aludida, de aquí que se efectuasen cambios en esta etapa de purificación, (BOADO y col. 129) y desde este momento el procedimiento seguido ha sido el siguiente: activación del Florisil a 640°C, enfriando en desecador al resguardo de la luz y desactivado parcialmente por adición de un 7% de agua destilada (según los métodos oficiales franceses) (130). La cantidad de este adsorbente empleada, unos 10 g., (vease 3.6.2) se coloca en una columna de 14 mm. de diámetro interior, amén del sulfato sódico en la cabecera, como en el procedimiento de Mills.

Como eluyentes se ha utilizado: para el primer eluato 100 cm³ de eter de petróleo (siempre purificado) y para la obtención del segundo eluato, 50 cm³ de la mezcla eter sulfúrico-eter de petróleo (20+80) v/v. De esta manera se obtienen buenos resultados y economizan reactivos.

3.6.1.- Estudio de la recuperación:

La comprobación de esta técnica de purificación se ha efectuado utilizando 2 cm^3 de solución patrón mixta en la que se ha determinado el % de recuperación de cada uno de los componentes llevando ambos eluatos a 2 cm^3 .

De la comparación de resultados encontrados en 10 cromatogramas de la solución patrón, obtenidos por inyección directa (fig. 9a) y otros tantos por cada eluato (Fig. 9by-9c) trabajando en igualdad de condiciones (cuadros V y VI), puede establecerse el porcentaje de recuperación.

En el cuadro V se recogen los valores de áreas para cada pesticida de la solución patrón por inyección directa de la misma así como su promedio, amplitud y coeficiente de variación %. Análogamente, en el cuadro VI, se resumen los valores encontrados con los concentrados del primer y segundo eluato en iguales condiciones. Entre estos y aquellos puede establecerse el % de recuperación de cada pesticida comparando los promedios antes y después de eluidos. El promedio del valor obtenido con pesticida en el eluato correspondiente (cuadro VI), dividido por el área media de ese mismo componente en la solución patrón (cuadro V) multiplicado por 100 ex-

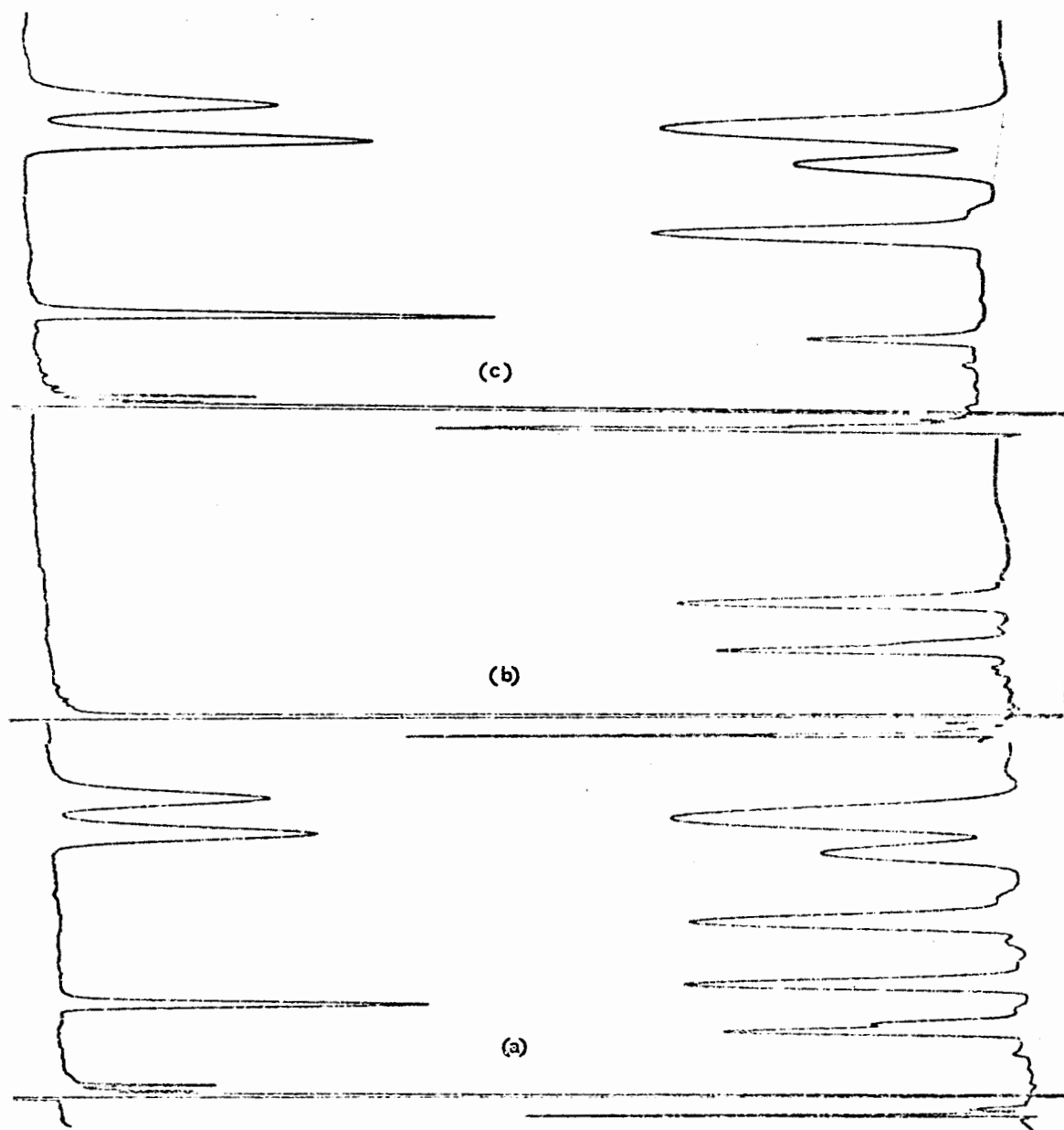


FIGURA 9.- Cromatogramas obtenidos con la solución patrón mixta
utilizando los detectores de ECD y KC1TD:
a) Cromatograma de la solución patrón mixta
b) Cromatograma del primer eluato
c) Cromatograma del segundo eluato

AREAS EN cm^2 DE LOS PICOS DE PESTICIDAS DE LA SÓLUCION
PATRON MIXTA

INYECCION	HEPTA- CLOP	HEP. EPOXIDO	MALATION		DIELDRIN	ETION		TRITION	
	EC	EC	EC	KC1TD	EC	EC	KC1TD	EC	KC1TD
1°	1,65	2,29	0,68	1,26	3,03	2,17	2,31	5,07	5,25
2°	1,67	2,24	0,68	1,24	3,01	2,10	2,27	5,01	2,14
3°	1,58	2,18	0,64	1,21	2,92	1,99	2,14	4,8	1,92
4°	1,63	2,21	0,69	1,34	2,92	2,10	2,38	4,9	2,18
5°	1,45	1,95	0,61	1,30	2,75	1,98	2,21	4,58	1,97
6°	1,56	2,13	0,66	1,35	2,81	2	2,17	4,66	2,03
7°	1,56	2,13	0,64	1,29	2,82	1,97	2,17	4,64	1,99
8°	1,58	2,13	0,68	1,31	2,88	2,04	2,17	4,69	1,94
9°	1,56	2,16	0,66	1,37	2,90	2,02	2,14	4,67	1,94
10°	1,58	2,16	0,66	1,35	2,86	2,02	2,14	4,77	2,04
\bar{X}_1	1,58	2,15	0,66	1,30	2,89	2,04	2,21	4,77	2,04
s	0,0608	0,0900	0,0225	0,0514	0,0867	0,0645	0,0829	0,1677	0,1115
Coefficien te de va- riación %	3,84	4,18	3,86	3,95	3,00	3,16	3,75	3,51	5,46
Amplitud	1,45- 1,67	1,95- 2,29	0,61- 0,69	1,21- 1,37	2,75- 3,03	1,97- 2,17	2,14- 2,38	4,58- 5,07	1,92- 2,25
(ng)	0,57	0,96	5,76	1,44	1,34	3,84	0,96	6,72	1,68

CUADRO V

AREAS DE LOS PESTICIDAS EN LOS ELUATOS 1° Y 2° DE LA
SOLUCION PATRON MIXTA

INYECCION	1er ELUATO		2° ELUATO							
	HEPTA- CLOR	HEP- EPOXIDO	MALATION		DIFLOR.	ETION		TRITION		
	ECD	ECD	ECD	KCITO	ECD	ECD	KCITO	ECD	KCITO	
1°	1,34	1,97	0,64	1,24	2,88	2,06	2,20	4,53	1,70	
2°	1,38	2,02	0,66	1,27	2,88	1,99	2,20	4,44	1,78	
3°	1,38	2,02	0,67	1,29	2,92	2,06	2,23	4,58	1,56	
4°	1,36	2,06	0,68	1,23	2,92	2,02	2,13	4,56	1,70	
5°	1,36	1,96	0,69	1,35	2,96	2,06	2,18	4,56	1,75	
6°	1,38	2,02	0,68	1,27	2,90	2,06	2,11	4,56	1,64	
7°	1,38	1,98	0,69	1,25	2,88	2,06	2,13	4,56	1,65	
8°	1,39	2,04	0,68	1,23	2,86	2,02	2,10	4,50	1,61	
9°	1,39	2,02	0,68	1,22	2,88	2,02	2,10	4,50	1,66	
10°	1,4	2,05	0,69	1,25	2,88	2,06	2,14	4,58	1,70	
\bar{X}_2	1,37	2,01	0,67	1,26	2,89	2,04	2,15	4,53	1,69	
s	0,0177	0,0337	0,0163	0,0302	0,0295	0,0260	0,0685	0,0147	0,0513	
Coeficien te de va- riación %	1,29	1,67	2,43	3,01	1,02	1,27	2,17	0,98	3,01	
Amplitud	1,34- 1,4	1,96- 2,06	0,64- 0,69	1,22- 1,35	2,86- 2,96	1,99- 2,06	2,18- 2,23	4,44- 4,58	1,64- 1,78	
\bar{X}_1	1,58	2,15	0,66	1,30	2,89	2,04	2,21	4,77	2,04	
Recupera- ción	87%	93,3%	102%	97%	100,2%	100,1%	97,3%	95,1%	83,2%	

CUADRO VI

presa la recuperación en tanto por ciento (cuadro VI). Como puede observarse la recuperación encontrada es aceptable en todos los casos, ya que se alcanzan valores por encima del 87% y por debajo de 102, excluyendo el Triti³ con de tector termoi³ónico que resulta algo más bajo (83,2%).

Todos estos datos permiten además realizar un estudio de precisión de la inyección, dado que cada serie obtenida tiene un coeficiente de variación inferior a 4 si se exceptúa el triti³ con detector KClTD. También puede observarse que cuando un componente da respuesta en dos detectores, el coeficiente de variación % es inferior en los resultados hallados con el detector de captura de electrones (vease Cuadros V y VI), lo que prueba la mayor estabilidad en la respuesta de este detector:

3.6.2.- Normalización del florisil:

(*) NOTA.- *Este cálculo es independiente de las cantidades inyectadas dado que se admite han sido las mismas en ambas series de valores.*

Una vez observado que, siguiendo este método de purificación y separación, el % de recuperación ha sido satisfactorio, se ha evaluado la capacidad de adsorción del florisil así activado utilizando el método propuesto por la FDA (131) basado en la adsorción ejercida por el florisil sobre el ácido láurico que consideramos interesante transcribir.

Dicho procedimiento utiliza los siguientes reactivos:

- Solución de ácido láurico al 2% (p/v) en hexano
- Solución de fenolftaleína al 1% (p/v) en alcohol.
- Solución 0,05N de hidróxido sódico.

Procedimiento:

En un Erlenmeyer de 50 cm³, con tapón esmerilado se ponen 2 g. de florisil activado al que se añaden 20 cm³ de la solución de ácido láurico (400 mg.). Se tapa, se agita mecánicamente durante 15 minutos. Se deja sedimentar y se pipetea 10 cm³ del sobrenadante para otro erlenmeyer de

200 cm³. Se añaden a estos, 50 cm³ de etanol previamente neutralizados en presencia de fenolftaleína, valorándose seguidamente con sosa 0,05N, el ácido que ha quedado sin ser adsorbido.

Se denomina valor de ácido láurico a los miligramos de ácido que han sido absorbidos por 1 g. de florisil. Calculando experimentalmente los mg. de ácido láurico que son neutralizados por 1 cm³ de la disolución de sosa y llamando a este valor "a", el VALOR DE ACIDO LAURICO será igual a $200 - xa$, siendo x el volumen de sosa gastado en valorar el ácido remanente. Los valores encontrados experimentalmente para este índice han sido de 100 o muy próximos a 100 cuando la determinación se hace al segundo día de activar el florisil. La determinación diaria de este valor, permite conocer que el florisil puede permanecer con el mismo grado de actividad hasta quince días después de su activación, si es guardado al resguardo de la luz y humedad en un frasco color topacio herméticamente cerrado.

No obstante, después de quince días se puede usar el mismo florisil aumentando la cantidad del mismo a poner en la columna (normalmente de 10 g.) cantidad que establecemos según un criterio semejante al seguido por la FDA (131), por

la siguiente fórmula:

$$\text{g. de florisil} = \frac{100}{\text{Índice ác. laurico}} \times 10$$

3.7.- ANALISIS CUALITATIVO DEL EXTRACTO ETereo:

Una vez hecha la purificación, el extracto es sometido al análisis por GLC así como a diversas pruebas de confirmación.

3.7.1.- Condiciones de trabajo en cromatografía gaseosa:

- Columnas: las descritas en 3.1. a base de DC-200 y QF-1
- Temperatura en la estufa 200°C
- Temperatura en el bloque de inyección 320°C
- Temperatura en el detector de captura de electrones. 210°C
- Voltaje del detector de captura de electrones: 1,5 v., óptima para la obtención de la mejor respuesta.
- Sensibilidad de registro:

La señalada en los cromatogramas: En General en tre $1/5 - 1/10$ ($2,5 \times 10^{-11} - 5 \times 10^{-11}A$), para el ECD con la que se obtiene una respuesta de media escala inyectando $1,5 \text{ ng}$ de heptaclor epó xido, y entre $1/50 - 1/100$ ($2,5 \times 10^{-10} - 5 \cdot 10^{-10}A$), para el detector de KC1TD, con la que se obtiene una respuesta de media escala inyec- tando $1,5 \text{ ng.}$ de malati6n. En el detector de F.I.D. se ha trabajado siempre con igual atenua- ci6n que en el ECD.

- Caudal de gas portador

Nitr6geno N-47: 120 ml/mn , en el detector ECD
 24 ml/mn , en el detector FID-
KC1TD .

Hidr6geno N-39: 24 ml/mn

Aire: 300 ml/mn .

- Cantidad de muestra = $2-8 \text{ } \mu\text{l}$.

- Velocidad de papel de registro 5 mm/mn .

- Detectores: FID - ECD y KC1TD.

3.7.2.- Detectores utilizados:

El análisis por cromatografía de gases ha sido realizado empleando tres detectores: el de captura de electrones (ECD), específico de sustancias con electroafinidad (clorados y fosforados principalmente), sensible a cantidades del orden de ng o pg; el de ionización de llama (F.I.D.), detector de alta sensibilidad del orden de µg, útil en la detección de sustancias orgánicas en general; y el detector termoiónico de cloruro potásico (KC1TD) específico de sustancias conteniendo fósforo o nitrógeno a las que puede detectar a nivel de Pg . Otros pesticidas orgánicos sin fósforo o nitrógeno, no son detectados.

3.7.3.- Preparación del detector termoiónico:

Este detector se ha preparado utilizando el detector de llama (FID) del cromatógrafo Perkin-Elmer F-11.

La modificación consiste en la incorporación de una sal alcalina de forma permanente a la llama, en este caso se ha escogido ClK ya que esta sustancia, entre las muchas propuestas (SO₄Na₂ ClK, SO₄Cs₂, etc.) al tener como anión un

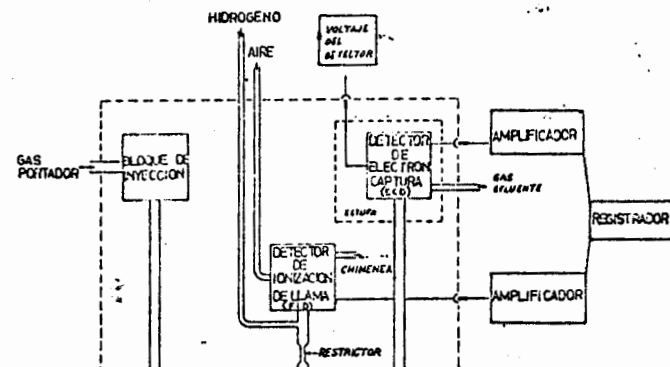
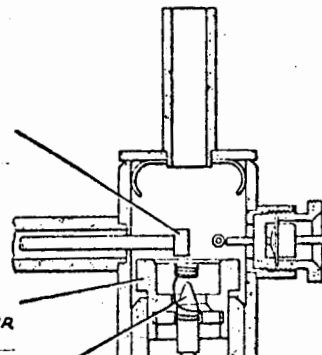
halógeno consigue eliminar la respuesta de este detector a los pesticidas clorados.

Aquella adaptación, produce un notable incremento en la respuesta del detector altamente selectiva para algunos pesticidas. Esto es debido a que cuando los compuestos que contienen nitrógeno o fósforo, arden en la atmósfera de la sal alcalina incandescente, producen una intensa respuesta eléctrica, lo cual hace que este detector sea altamente selectivo para organofosforados y carbamatos.

El detector se prepara siguiendo las instrucciones del AOAC (85), fundiendo el KCl sobre una espiral de platino que luego se coloca concéntricamente en el mechero del detector de ionización de llama de tal forma que este quede rodeado por aquella espiral y a una distancia del mechero no superior a 2 mm. A mayor altura, parece reducirse la selectividad de este detector para los fosforados. Para su construcción hemos utilizado un hilo de platino de 12,4 mm. de largo x 0,35 mm. de diámetro con el que se hicieron 7 vueltas de diámetro igual al *jet* del detector. Cuatro de ellas quedan separadas unos 2 mm., de las otras tres que permiten adaptar esta pieza al pequeñísimo mechero (fig. 10a). Para su im-

ELECTRODO
COLECTOR

ELECTRODO
POLARIZADOR



pregnación, con ayuda de unas pinzas se introdu
ce la espiral en una solución saturada de ClK pu
rísimo y seguidamente se expone a la llama inco-
lora de un mechero Bunsen en la zona de colora-
ción, repitiendo varias veces la operación hasta
obtener una impregnación uniforme y conveniente.

Una vez puesta esta pieza en el detector de
llama (fig. 10a) se enciende este y se deja acon
dicionar 12 horas durante las cuales la respuesta
no es repetitiva y la línea base presenta mucho
ruido (oscilaciones frecuentes y rápidas).

La magnitud de la respuesta de los componentes
fosforados está estrechamente relacionada
con la temperatura de la llama alcalina y ésta,
a su vez, depende de la proporción H_2/N_2 en la
llama, por lo que se hace necesario determinar
estos factores de forma experimental. En este mo
delo de cromatógrafo se ha dispuesto un divisor
unido a un restrictor de 0,25 mm. de diámetro in
terior que proporciona un reparto de 1/5 con venta
ja para el ECD (fig. 10b). Esta circunstancia
presenta la ventaja de que la corriente de hidróg
eno necesaria produce una succión en el gas
efluente de la columna que acelera el paso de
los componentes con lo que la resolución de los
picos es sensiblemente mejorada por reducirse el

volumen muerto en este detector desaparecen las colas en los componentes (vease cromatogramas). Sin embargo, el flujo de hidrógeno no debe ser excesivamente grande, puesto que además de no permitir una línea base regular y constante, la sensibilidad de el KClTD se ve muy disminuía. Por todo ello, después de diferentes pruebas se ha llegado a establecer los caudales óptimos para este detector y modelo de cromatógrafo, en 24 ml./min. para hidrógeno e igual cantidad de nitrógeno.

3.7.4.- Comparación de la respuesta entre los diferentes detectores:

Para comprobar la selectividad del detector de KClTD a los compuestos fosforados y clorados y establecer una relación entre dicho detector y el FID hemos ensayado con la disolución patrón mixta antes empleada en el estudio de la recuperación, pero la excesiva cantidad de soluto que sería necesaria para obtener respuesta en el detector de llama han hecho imposible el estudio de comparación de ambos detectores. Sin embargo, esta comparación es fácil de efectuar entre los detectores de captura de electrones (ECD) y el termoiónico (KClTD), dado que los niveles de sen

sibilidad son de un orden parecido.

En el cuadro VII y en los cromatogramas de la Fig. 9, se encuentran los resultados obtenidos con la disolución patrón. De la observación de los mismos puede deducirse: 1°) que los pesticidas organoclorados no dan respuesta en el detector termoiónico, en tanto que los pesticidas organofosforados producen respuesta en ambos detectores (especificación de estos detectores que será utilizada con fines analíticos); 2°) que el detector termoiónico es más sensible a los compuestos organofosforados que el de captura de electrones, pues aunque aparecen registrados como picos de casi igual área, hay que tener presente la distinta atenuación de dichos registros. Esta circunstancia permite obtener los valores incluidos en el cuadro VII donde aparece el área medida para cada componente por la atenuación a que ha sido registrado y la cantidad de componente recibida en el detector. $1/5$ y $4/5$, respectivamente para el detector termoiónico y el de captura. Finalmente refiriendo el área de cada pico a la misma unidad, (ng.), se puede concluir que el detector termoiónico utilizado es aproximadamente, 100, 50 y 25 veces más sensible que el de captura de electrones para malatión, etión y tritión, respectivamente.

COMPARACION DE LA SENSIBILIDAD EN LOS DETECTORES DE CAPTU-
RA DE ELECTRONES Y TERMOIONICO

PESTICIDA/ DETECTOR	ng. INYECTADOS	AREA TOTAL mm ²	AREA por ng.	RESP RELATIVA KC1TD/EC
MALATION-KC1	1,164	19.540	16.780	

3.7.5.- Introducción de las muestras:

Las muestras han sido inyectadas por mediación de una jeringa Hamilton de 10 μ l; la lectura del volumen inyectado se efectúa para mayor exactitud, por diferencia entre el volumen antes y después de inyectar.

La cantidad de muestra inyectada ha de encontrarse entre los 2 y los 8 μ l. para que el error de la inyección sea mínimo y además se ha de procurar que dicho volumen lleve una cantidad de pesticida cuya respuesta en el cromatógrafo se encuentre dentro de la zona en que la respuesta es lineal.

La jeringa se lava inmediatamente después de su uso por paso de eter a petróleo con la ayuda del vacío producido con una trompa de agua. Este lavado es conveniente hacerlo entre cada inyección, aunque se inyecte la misma solución, pues de lo contrario, el volumen remanente en la jeringa se va concentrando obteniéndose respuestas cada vez algo superiores. Cuando por cualquier causa el émbolo se atasca hay que recurrir a un lavado con detergente y agua haciendo pasar a continuación un volumen de acetona para secar y luego eter. Si esto no fuese suficiente, un lavado con ácido nítrico excepcionalmente o bien

con una disolución acuosa de ácido sulfúrico y anhídrido crómico es de gran eficacia. (ojo, pue de atacarse el acero del émbolo y agujas).

3.7.6.- Criterios de identificación y confirmación:

El extracto, en una primera etapa es inyectado en el cromatógrafo provisto de la columna DC-200, el detector de captura de electrones (ECD) y uno de los otros dos detectores.

Cuando la cromatografía es efectuada correctamente y no aparecen respuestas importantes en los cromatogramas de los dos eluatos obtenidos en la columna de florisil, indica ausencia de pesticidas por encima de los límites de detección. No hay que olvidar que la presencia de pesticidas puede estar limitada por el método de extracción, preparación de eluatos y por las condiciones de la GLC.

La aparición de un pico en un cromatograma indica, en principio, la presencia de una sustancia. La asignación a un pesticida requiere una serie de confirmaciones que se fundamentan en la utilización de los criterios y métodos siguientes:

3.7.6.1.- Tiempo de retención relativos al aldrin. - Una vez obtenido el cromatograma, el primer dato que orienta sobre su identidad es el tiempo de retención (Tr) dado que este valor es constante para cada columna, siempre que se opere en idénticas condiciones.

Para mayor seguridad, se calcula el tiempo de retención relativo al aldrin (Trr) y además de compararlos con los que figuran en la bibliografía (35) se comparan con los obtenidos por inyección de soluciones patrón de los pesticidas sospechados en la muestra, ya que hemos comprobado ligeras diferencias entre estos valores y los relacionados en la bibliografía (vease cuadro VIII).

Aun así, como puede observarse en el cuadro citado, los tiempos de retención de algunos pesticidas son muy próximos entre sí por lo que este criterio resulta insuficiente para asegurar la identidad de una sustancia. Para salir de duda en aquellos casos en que la hubiese y en todo momento para confirmar la sospecha con aquellos otros más claros es conveniente observar el comportamiento en las siguientes pruebas.

VALORES "P" Y TIEMPOS DE RETENCION DE PESTICIDAS ORGANO-
CLORADOS Y ORGANOFOSFORADOS.

PESTICIDA	ELUATO	Trr (DC-200)	Trr (QF-i(DC-200)	Valer "P" Hexano/Etanol-90
α -HCH	1°	0,39	0,45	-
Lindano	1°	0,47	0,57	0,46
Heptaclor	1°	0,82	0,80	0,72
Malatión	2°	0,93	1,46	0,16
Aldrín	1°	1,0	1,0	0,77
Heptaclor- epoxido	1°	1,28	1,45	0,60
pp'DDE	1°	1,84	1,85	0,73
Dieldrín	2°	1,87	2,22	0,59
Endrín	2°	2,04	2,54	0,69
op'DDT	1°	2,46	2,43	0,74
Etión	2°	2,50	2,73	0,45
Tritión	2°	2,85	3,85	0,58
pp'DDT	1°	3,03	3,15	0,65

CUADRO VIII

3.7.6.2.- Empleo de la columna de florisil.- Como ya se ha indicado, la columna de florisil, no so lo es una técnica de purificación sino que al mismo tiempo es una técnica de separación que permite obtener pesticidas de Tr muy próximos en eluatos diferentes (cuadro VIII). De esta forma se puede asegurar por ejemplo que el pico con Tr 1,84 en DC-200, correspondiente a un cromatograma de un primer eluato, no puede ser el Dieldrín ya que éste se eluye en el segundo (veáanse más detalles de esta operación en 3.6).

3.5.6.2.- Uso de distintas columnas en GLC.- De igual forma, los pesticidas con Tr iguales o muy próximos en la columna DC-200 de naturaleza apolar pueden presentar en la columna QF-1/DC-200, de naturaleza semipolar, Tr muy distintos, o a la inversa como sucede en el caso de el Malatión y Heptaclor epóxido.

El Dieldrín y pp'DDE además de la separación con el Florisil, quedan también diferenciados haciendo uso de dos columnas de diferente polaridad.

Además, la determinación cuantitativa de cada compuesto en ambas columnas, permite averiguar si en una de ellas existe alguna sus-

tancia. interferente. Como es lógico, sí en una de las columnas se obtiene una cantidad de pesticida inferior a la calculada en la otra, dicha circunstancia sería explicada porque pesticida y sustancia interferente son cromatografiados separadamente en unas condiciones mientras que en las otras no. Existen sin embargo sustancias contaminantes interferentes, los policlorobifenilos (PCB) que tienen infinidad de componentes y algunos de ellos con igual tiempo de retención al de muchos pesticidas, en ambas columnas. Este problema se resuelve como luego veremos en la sección de pruebas químicas.

3.7.6.4.- Uso de los tres detectores (FID, ECD, y KC1TD).- La identificación de los componentes separados por cromatografía de gases puede verse ayudada por la especificación de cada uno de estos detectores.

Inicialmente se inyecta la muestra empleando simultáneamente los detectores de captura de electrones y el de ionización de llama de hidrógeno lo que permitirá observar que prescindiendo del disolvente que dará señal en am-bos:

- 1°.- Sí solo hay respuesta en el detector de llama de hidrógeno, la sustancia no tiene electroafinidad y no tiene interés para este estudio (ej.: Fig. 28).
- 2°.- Sí hay respuesta positiva en ambos detectores, es decir si aparece respuesta en los dos detectores con igual tiempo de retención, posiblemente no será una sustancia pesticida, pero habrá de confirmarse.
- 3°.- Sí solo hay respuesta en el detector de captura de electrones, puede asegurarse la presencia de una sustancia con electroafinidad y posiblemente de un pesticida. Igualmente habrá de confirmarse mediante otros criterios señalados más adelante.

Una vez obtenida la respuesta en aquellas condiciones se adapta una espiral de platino, impregnada de ClK, al "jet" del FID (vease 3.7.3) y despues de estabilizada la línea base, se procede a una nueva inyección. Los cromatogramas obtenidos ahora serán, por lo que se refiere al detector de captura de electrones, iguales a los anteriores. En tanto que los producidos por el detector termoiónico serán diferentes ya que al trabajarse a una sensibilidad al menos 100 veces menor, los picos antes detectados en llama pasa-

ran desapercibidos, pudiendo asegurarse sí aparece respuesta, la presencia de residuos fosforados o carbamatos, los organoclorados, dada la peculiaridad de este detector, no dan ninguna respuesta (obsérvese este detalle en los cromatogramas de la Figura 9). En caso de producirse respuesta positiva en el detector de KClTD, se vería refrendada por otra respuesta a igual tiempo de retención en el detector de captura de electrones y en todo caso por una prueba positiva de inhibición de la colinesterasa. En el extracto de diclorometano (véase 3.9) y en consecuencia por las técnicas de confirmación usadas para estos pesticidas. "

3.7.6.5.- Valor "p". - Es un valor constante relacionado con el coeficiente de reparto, que es determinado por distribución de un soluto (el pesticida) entre volúmenes iguales de dos fases inmiscibles previamente equilibradas (es decir saturadas una con otra) y a temperatura definida.

Puede darse el caso de que un componente no pesticida, u otro distinto del sospechado, sea eluído de la segunda columna con el tiempo de retención esperado para este. El problema mencionado se subsana hallando el valor "p" para los pi-

cos obtenidos en ambas columnas y en caso de corresponder al mismo pesticida, ha de dar un valor exactamente igual.

Como es sabido, las cantidades de soluto que se distribuyen entre dos solventes no miscibles, es un valor constante a una determinada temperatura. Por la misma razón, la relación entre las áreas que en GLC determinan las cantidades de soluto que hay en uno de los solventes antes y después de agitarlo con un volumen igual y equilibrado de otro solvente inmiscible, es también una constante, siempre que se opere en la zona en que la respuesta es lineal. Esta razón se denomina en la literatura "pV" o valor "p", y permite la identificación de sustancias a nivel de nanogramo.

Por nuestra parte, en la identificación de residuos, hemos usado el sistema de solventes hexano-etanol 90.

Procedimiento:

En general se ha seguido el método propuesto por la Food and Drug Administration (93). Se prepara una solución de diferentes pesticidas en hexano saturado de etanol (90%). 5 cm³ de esta solución se agitan fuertemente durante 1' con

otros 5 cm³ de etanol-90 previamente saturado de hexano y se dejan separar ambas fases. Se inyectan tres veces 4 µl de la solución patrón obteniendo una altura media "a" y a continuación otras tres veces, 4 µl. de la fase superior (hexano) obteniéndose una altura media "b" lógicamente inferior. La razón "b/a" da directamente el valor "p", veanse los resultados en el Cuadro VIII.

Estos valores han sido obtenidos operando con soluciones patrón que contenían:

			Heptaclor-epóxido	0,2 mg/l
Lindano	0,05 mg/l	Malation	1,2	"
Heptaclor	0,05 "	Etion	0,8	"
Aldrín	0,1 "	Trition	1,4	"
Dildrín	0,15 "	pp'-DDE	0,3	"
Endrín	0,15 "	op'-DDE	0,3	"
		pp'-DDT	0,3	"

Estando por tanto dentro de los límites de la zona en que la respuesta del detector es función lineal ng/área.

Cuando esta técnica se utiliza en la identificación de alguno de los picos de la muestra, es necesario:

- 1°.- Elegir el par de disolvente más adecuado; es decir, que si existe duda entre compuestos de Tr próximo ha de elegirse aquellos disolventes que den un valor "p" bién diferenciable. En este sentido el par hexano:etanol de 90% (v/v) ha sido útil en la generalidad de los casos aun cuando a veces fué necesario recurrir a otras mezclas.
- 2°.- Someter el extrato de la muestra a evaporación lenta para eliminar el eter de petróleo, ya que este disolvente resultante de de la cncentración de un volumen muy superior, no presenta una composición definida constante y por ello no sirve para obtener los valores "p". Una vez obtenido el residuo seco de los extractos se disuelven los resíduos en 5 cm³ de hexano saturado de etanol 90% operando de igual forma a como se ha indicado con la solución patrón.
- 3°.- Comprobar si el contenido en componente a investigar es tal que operando en las condiciones indicadas existe una función conc/área lineal. De no ser así, se hace la dilución o concentración necesaria.

3.7.6.6.- Radiaciones ultravioleta. - Un método intentado para la confirmación de resultados, ha sido la utilización de radiaciones ultravioleta. Estas radiaciones provocan la desaparición de pesticidas en un tiempo determinado, así como la transformación en otros compuestos que cromatografian con tiempos de retención diferentes.

Debido a la presencia de "coextractivos", hemos aprovechado únicamente el tiempo de desaparición, para averiguar en ocasiones la presencia de cualquier sustancia interferente. Para ello, siguiendo con alguna variante el método de KAUFMAN (95), se determinan en una solución patrón los tiempos de desaparición (cuadro IX).

Procedimiento:

En una célula de cuarzo de las utilizadas en espectrofotometría de U.V., se pone una cantidad de solución patrón de $0,4 \text{ cm}^3$, conteniendo cantidades de pesticida del orden de nanogramos. Se evapora el disolvente lentamente a temperatura ambiente sobre una de las caras transparentes de la célula en posición horizontal, para que el residuo quede formando una fina película. Después se tapa y se expone a la luz ultravioleta de 254 nm a una distancia de 2,5 cm. Después de la exposición, se añaden $0,4 \text{ cm}^3$ de hexano y se analiza

IRRADIACION CON UV APLICADA A PCB's, LINDANO E ISO-
MEROS DEL DDT

PESTICIDAS EN DISTINTAS CANTIDADES Y COMPONENTES INTERFERENTES DEL AROCLOR 1248 (112 ng. en total)	TIEMPOS DE IRRADIACION	
	120"	240"
0,1 ng. Lindano Pico - 1	D P	D P
0,25 ng. pp'DDE Picos 11-12	Desaparece P	- -
0,18 ng. op'-DDT Pico 13	D D	D D
0,6 ng. pp'DDT Pico 15	D D	D desaparece

D = se degrada

P = permanece inalterado

CUADRO IX

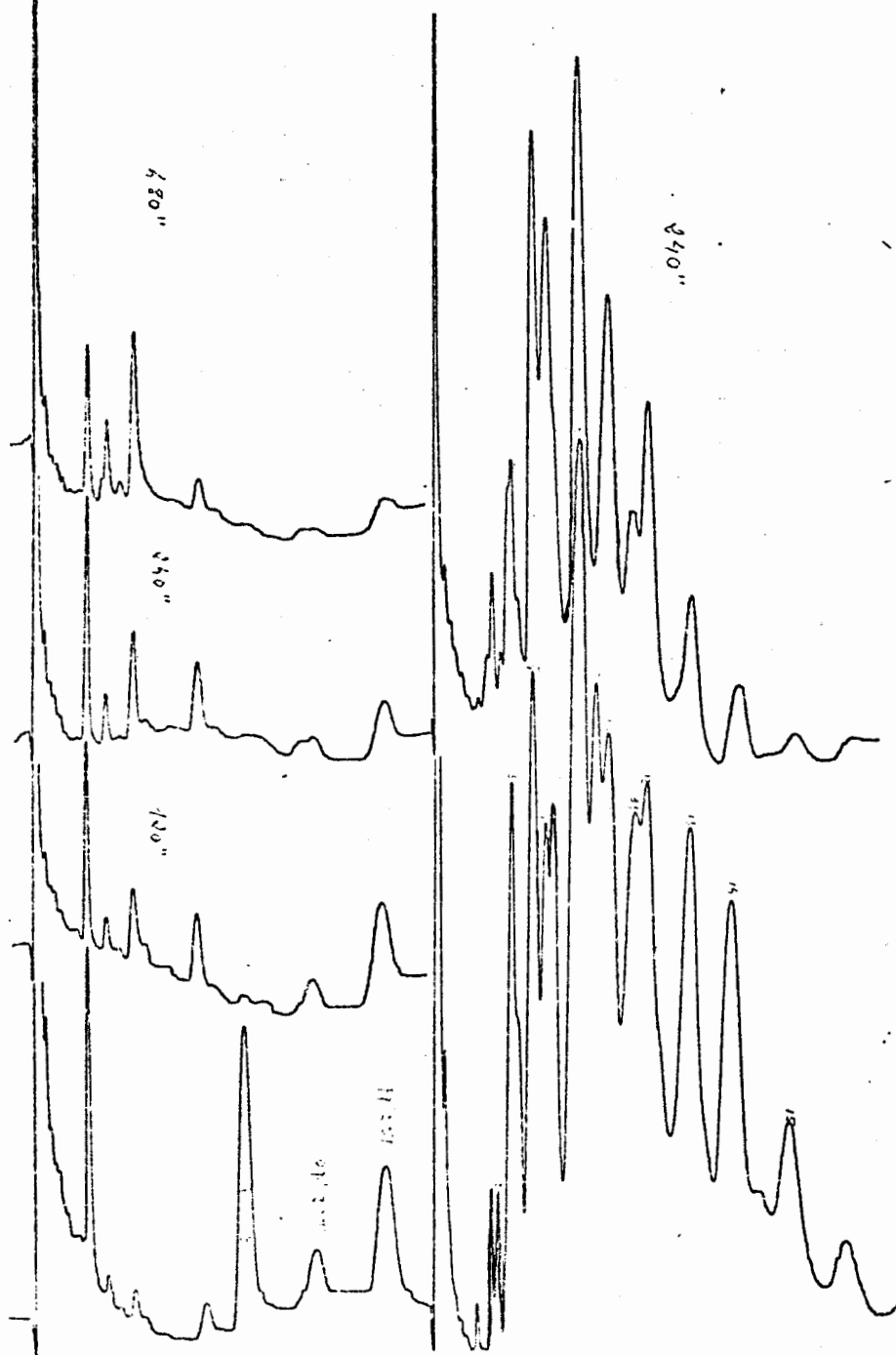
de nuevo mediante cromatografía de gases.

Al aplicar estos mismo tiempos de irradiación a una solución de aroclor 1248 (policlorobifenilos, PCB's, con un 48% en cloro) de 16 ppm, hemos visto el comportamiento de los componentes coincidentes con el Lindano, pp'-DDE, op'-DDT y pp'-DDT (picos 1, 11-12, 13 y 15, respectivamente, Fig. 11). En iguales condiciones, los compo-
netes PCB's presentaban áreas iguales o inferiores a las de los pesticidas coincidentes y a pesar de ello, como puede verse en el cuadro, el pp'DDE desaparece en los 120", quedando prácticamente inalterados los picos 11 y 12. No sucede igual con los demás policlorobifenilos que se van degradando casi al mismo tiempo que los pesticidas, más deprisa en el caso del pico 15 (Fig. 11) o algo mas despacio en el 13, o bien pesticida y PCB se resisten a la degradación total para tiempos inferiores a los 45' (Lindano y pico 1). De ello se deduce que esta prueba resulta rápida y sencilla para la confirmación de pp'-DDE (fig. 11), teniendo la precaución de utilizar cantidades del orden de los 0,25 ng para que el tiempo de los 120" sea válido.

FIGURA 11.- Irradiación con U.V. durante distintos tiempos:

a) Cromatogramas de arceior 1248

b) Cromatogramas de DDT's



3.7.6.7.- Pruebas químicas. - Estas pruebas han sido utilizadas en la confirmación de las siguientes sustancias:

3.7.6.7.a.- Confirmación del pp'-DDT: Siguiendo la técnica del tratamiento alcalino (88), se produce el paso de pp'-DDT a pp'-DDE. Para ello se evapora a sequedad una porción alícuota de muestra y se añade al residuo 1 cm³ de KOH metanólica 1N manteniéndola a 30°C durante 30 minutos. Se enfría, se añaden 3 cm³ de agua destilada y un volumen de eter de petróleo igual al tomado en la porción alícuota. Se agita fuertemente, se decanta y se inyecta la capa etérea. En el cromatograma habrá desaparecido totalmente el pico correspondiente pp'-DDT, si esta última sustancia era la única causante del mismo y aparecerá incrementado el pico del pp'-DDE (fig. 12). Esta prueba también permite confirmar la presencia de op'DDT y Lindano.

3.7.6.7.b.- Confirmación de pp'DDE: hemos aplicado el tratamiento con ácido crómico (89). Una parte alícuota del extracto etéreo de la muestra, se evapora a sequedad en un tubo de ensayo y el residuo se trata con 5 cm³ de reactivo de ácido crómico preparado por disolución de 5 g. de anhídrido crómico en 3 cm³ de agua destilada y adición de 60 cm³ de ácido acético glacial. El tubo con los 5 cm³ de este reactivo se mantiene durante 10 minutos a 75-80°C en un baño de agua y transcurrido este

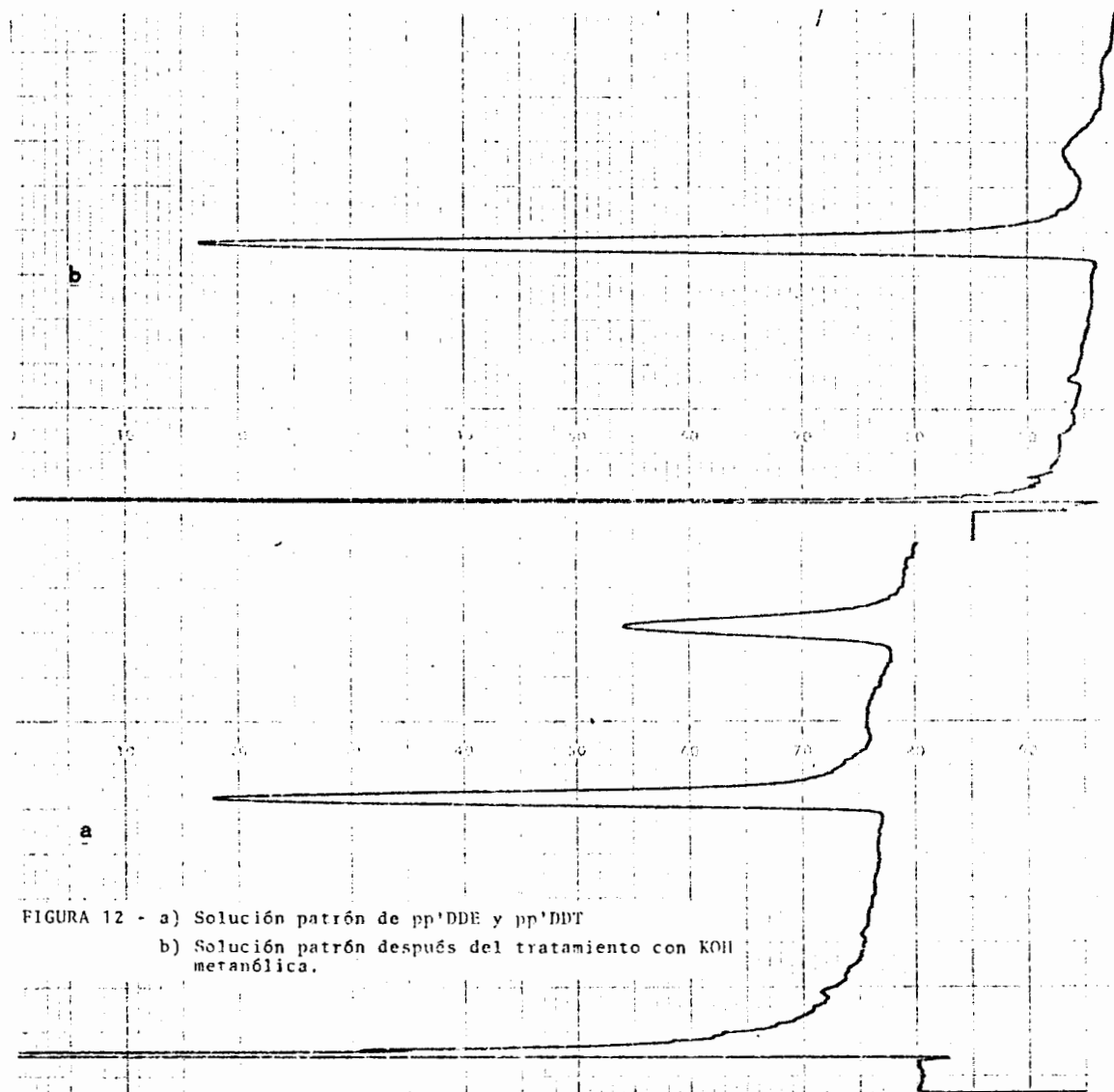


FIGURA 12 - a) Solución patrón de pp'DDE y pp'DDT

b) Solución patrón después del tratamiento con KOH metanólica.

tiempo se enfría el tubo y se pasa a una ampolla de separación que contienen 20 ml. de agua destilada y 20 cm³ de eter de petróleo. Se agita, se dejan separar ambas capas y se retira la acuosa. Se lava la capa etérea con otros 20 cm³ de agua destilada, se recoge la etérea en un matraz de 100 cm³, se deshidrata con SO₄Na₂ anhidro y se concentra hasta reducir el extracto a un volumen igual al primitivo. Si en la muestra solo había pp'-DDE a la altura de este pico, una vez hecho este tratamiento, no quedará ningún pico con ese Tr, y aparecerá otro correspondiente a la diclorobenzofenona de Tr 0,89 (fig. 13).

3.7.6.7.c.- Confirmación del Aldrín: Aunque se han obtenido picos con tiempo de retención próximo a 1 en casi todas las muestras, en algunas de ellas por el tamaño alcanzado y por la ausencia de respuesta en FID no se podía admitir una procedencia natural. Por el Tr y la ausencia de respuesta en el detector de KClTD parecía ser el Aldrín por lo que fué necesaria su confirmación, pues aunque se tratase de un caso esporádico que hacía pensar en una contaminación (dicho pesticida no lo contenían las aplicaciones), era importante poder descartar un coextractivo de esa importancia en las muestras.

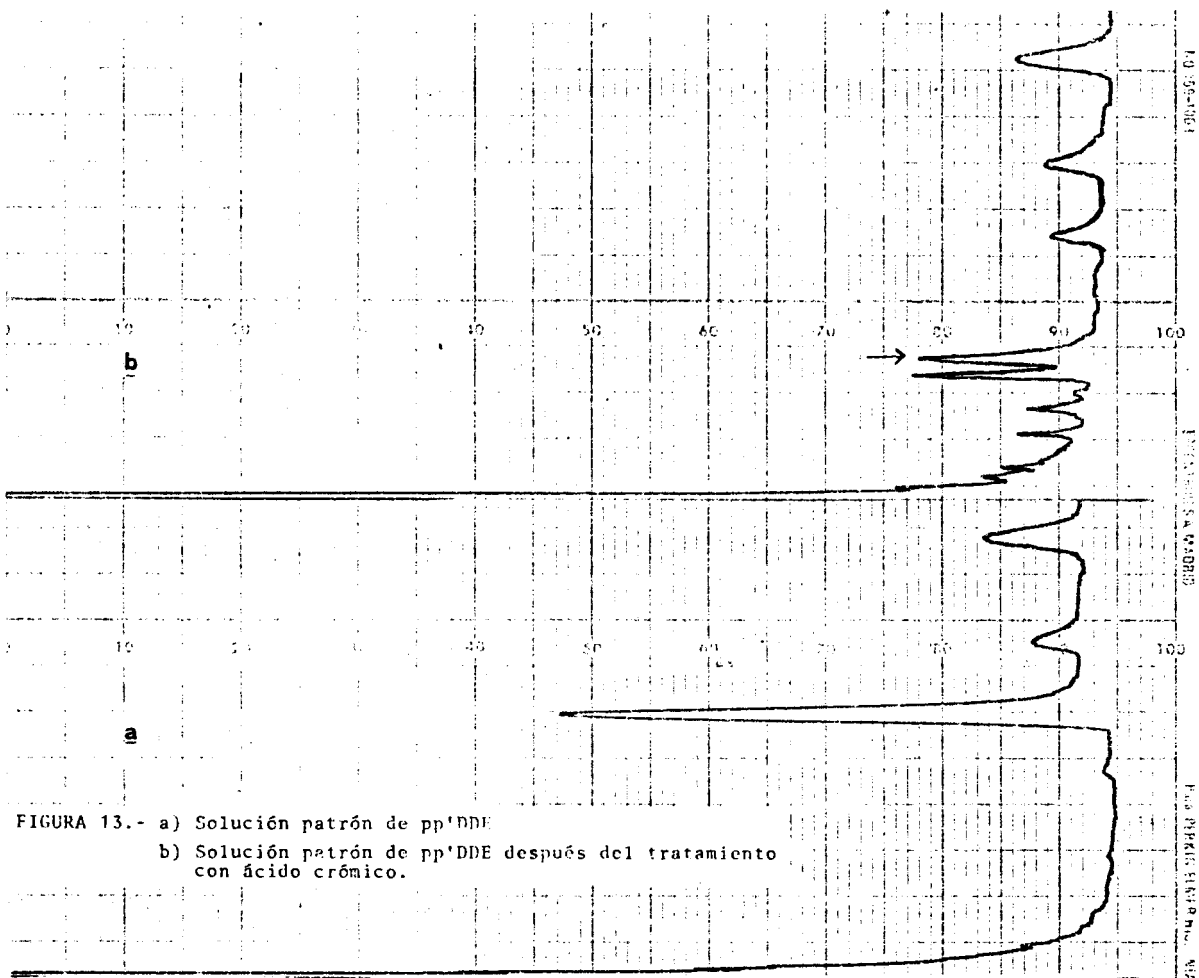


FIGURA 13.- a) Solución patrón de pp'DDE
b) Solución patrón de pp'DDE después del tratamiento
con ácido crómico.

Procedimiento:

Siguiendo el método empleado por NOREN (90) se evapora una porción alícuota del extracto etéreo hasta $0,5-1\text{ cm}^3$ y el residuo se pasa a un matraz con 25 cm^3 de benceno en el que se ponen a continuación: 2 cm^3 de peróxido de hidrógeno al 30% (p/p), 1 cm^3 de ácido acético glacial y 1 cm^3 de ácido sulfúrico concentrado. El matraz provisto de agitador magnético se tapa y se mantiene en un baño a 65° durante tres horas con agitación. Luego se pasa el contenido a una ampolla de separación de 125 cm^3 lavando el matraz con pequeñas porciones de benceno. Los líquidos bencénicos reunidos se lavan agitándolos con 25 cm^3 de una disolución acuosa de sulfito ácido de sodio al 10% (p/v). Después de separar la capa acuosa, se lava la bencénica con otros 25 cm^3 de una solución saturada de carbonato sódico y luego con porciones de 25 cm^3 de agua hasta que esta quede neutra. La capa bencénica se deseca con sulfato sódico anhidro y se concentra a vacío y 35°C hasta obtención de una cantidad más o menos igual a la inicial que a continuación se somete al análisis por cromatografía gaseosa.

En caso de existir Aldrín en la muestra, el ácido peroxiacético a 65°C lo oxida a Dieldrín apareciendo este en el nuevo cromatograma obteni

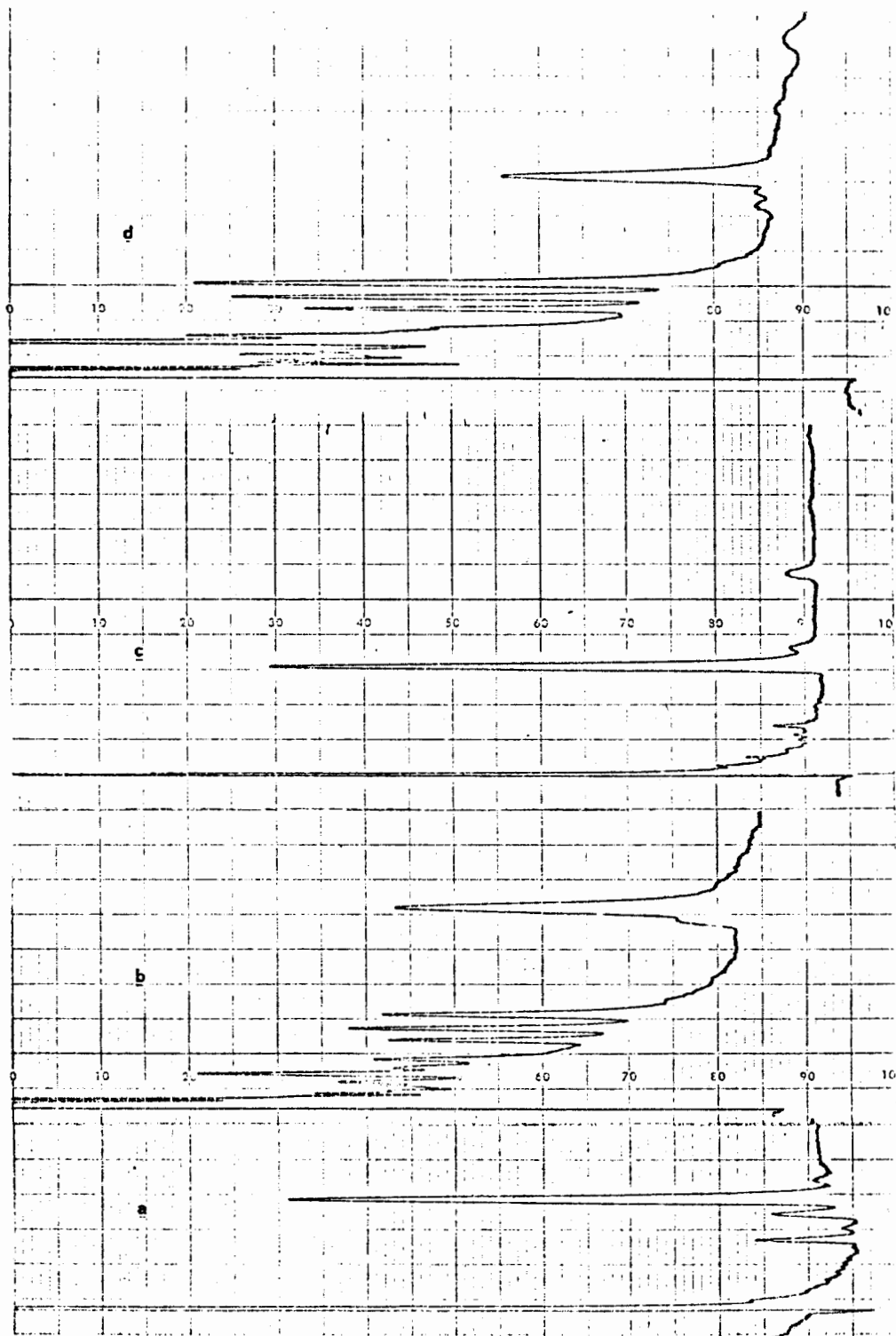


FIGURA 14.- a) Cromatograma de Aldrin de solución testigo
 b) Cromatograma de Aldrin después de epoxidación
 c) Cromatograma de SA-6-72
 d) Cromatograma de SB-6-72 después de epoxidación

do (fig. 14).

3.7.6.7.d.- Confirmación del Dieldrín: Igualmente fué necesaria la confirmación química de uno de los componentes de los cromatogramas que, esporádicamente también, apareció en algunas muestras y que por las demás pruebas parecía ser Dieldrín.

Reactivo: 0,1 g. de Cl_2Zn se disuelven en 2 cm^3 de clorhídrico concentrado y se diluyen hasta 25 cm^3 con etanol absoluto.

Procedimiento:

Siguiendo el método empleado por WIENCKE y BURQUE (91), una porción alícuota del extracto etéreo, conteniendo aproximadamente 0,1 $\mu\text{g.}$ de Dieldrín, se evapora a sequedad en un tubo de Kuderna y se disuelve el residuo formado en 1 cm^3 de eter de petróleo.

Se añaden 0,5 cm^3 del reactivo y se agita para mezclar bien. Se coloca el tubo en un baño maría de tal forma que no entre agua y que el volumen sea reducido a no menos de 0,1 cm^3 en un tiempo no inferior a 10 minutos. Se saca el tubo del baño y se enfría a temperatura ambiente agitando a continuación con 1 cm^3 de eter de

petróleo. Luego se añaden 2-3 cm³ de agua destilada y se agita de nuevo fuertemente durante 15 segundos. Por inyección de la capa etérea tendremos un informe más de este componente que cromatografía con el Trr del Dieldrín (fig. 15). En caso de existir este, la ruptura del grupo epóxido da lugar a la clorhidrina del dieldrín que tiene un Trr \approx 0,86.

3.7.6.7.e.- Confirmación de PCB's: También se ha dedicado atención a estos componentes tan ampliamente distribuidos en la naturaleza (132) y cuya presencia en el suelo, aunque de escasa referencia, se sabe tiene muy lenta desaparición debido a la escasa presión de vapor que alcanzan en la superficie de este medio (133).*

Además de la utilización de las radiaciones ultravioleta, la utilización de las pruebas químicas "a" y "b" para confirmación de pp'-DDT y pp'-DDE permiten poner de manifiesto la presencia de estos compuestos que

(*).- Estos contaminantes están constituidos por mezclas complejas de policlorobifenilos cuyas propiedades se parecen a las de los organoclorados relacionados con el DDT: son eluidos en el 1^{er} eluato en la columna de florisil y algunos de ellos tienen tiempos de retención coincidentes con los isómeros del DDT.

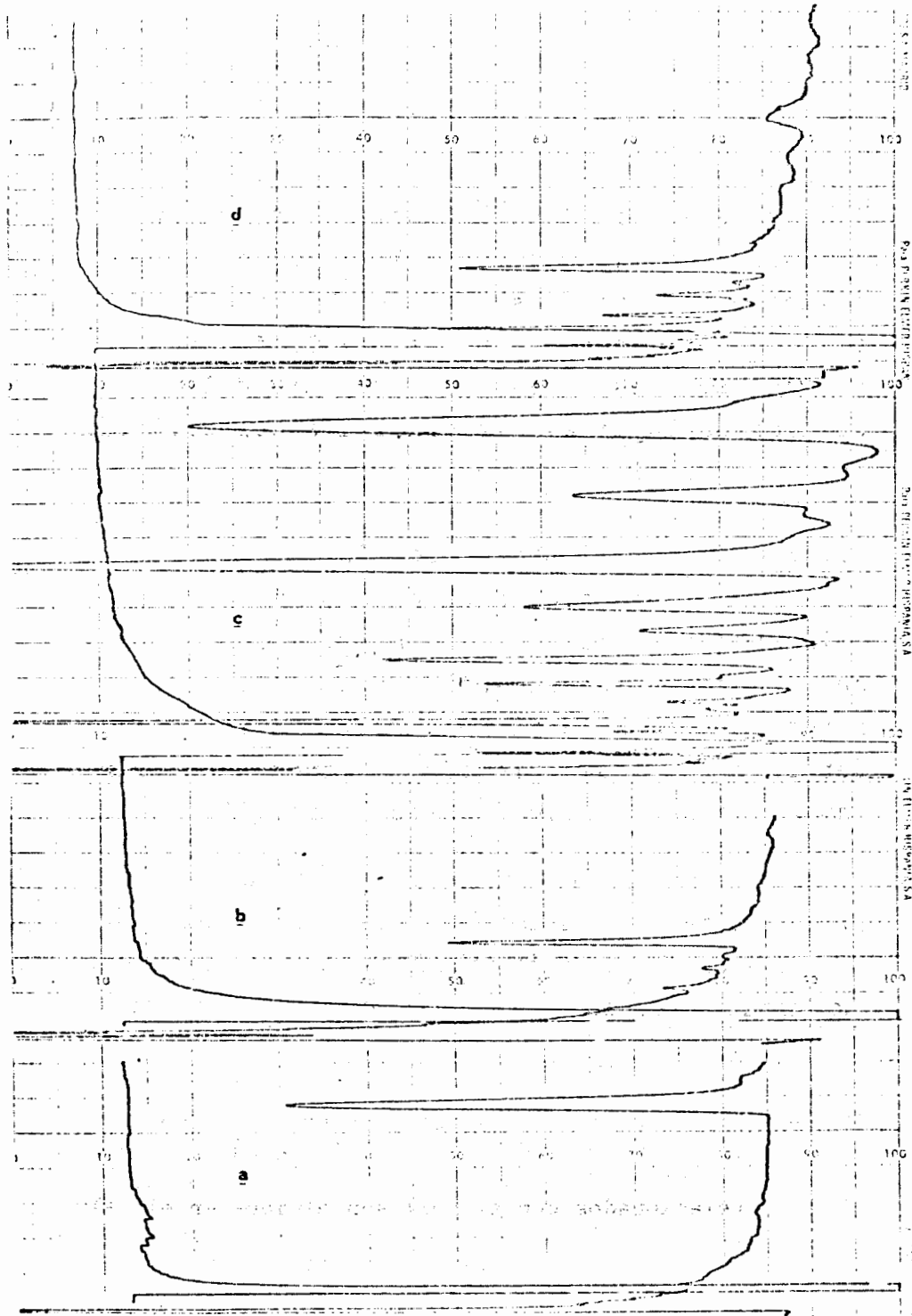


FIGURA 15.- a) Cromatograma de Dieldrin de solución testigo
 b) Cromatograma de Dieldrin después del tratamiento
 con clorhidrico
 c) Cromatograma de la muestra (N5-b-721)
 d) Cromatograma de la muestra después del tratamiento
 con clorhidrico

no sufren alteración con dichas pruebas. Su investigación ha sido necesaria no solo por la posible procedencia natural sino también por la problemática del almacenaje en bolsas de plástico, ya comentada en 3.3.2.

3.7.6.8.- Espectrofotometría de I.R.- La espectrofotometría IR tan empleada en la caracterización de sustancias orgánicas, ha resultado de poca utilidad para los extractos destinados a GLC, ya que los residuos encontrados en ellos pocas veces alcanzaron la concentración de 5-10 μg . que se requiere para conseguir un espectro mediante la técnica de microcomprimidos. Para la obtención de microgramos es necesaria la utilización de una gran cantidad de muestra y los *coextractivos* diversos alcanzan valores tan altos, que dificulten la aplicación de esta técnica. Su utilización sería de interés sí después de seguir el proceso analítico normal, hubiese una respuesta positiva en el detector de llama de hidrógeno, y como es sabido, esto solo ocurre cuando se encuentran en una cantidad del orden de microgramos.

Aunque no hubo ocasión de utilizar esta técnica con el propósito de identificar o confirmar pesticidas en los extractos de GLC, si se ha

utilizado para confirmar la presencia, en suelos, de restos de fuel-oil (vease fig. 29).

Esta técnica que no es viable en la identificación de los residuos que se determinan por GLC por trabajarse en ésta con una sensibilidad mayor, si es de gran valor en aquellas muestras con resultados altamente positivos en la inhibición de la colinesterasa, dado que el nivel de detección es de un orden parecido en ambos métodos analíticos.

3.7.7.- Interpretación cualitativa de los cromatogramas:

A lo largo del análisis, empleando los criterios y métodos expuestos, se han llegado a identificar la mayoría de los picos existentes en los cromatogramas. En los cuadros X, XI, XII, XIII, XIV y XV se expone el uso de los criterios de confirmación, figurando su aplicación al máximo número de picos encontrado para cada tipo de muestra, aun cuando, alguno de ellos, solo se haya encontrado esporádicamente.

Con la elución sobre florisil, tiempos de retención en las dos columnas y uso de los tres detectores (Fig. 16, 17, 18, 19, 20 y 21) se pue

SUELOS

CRITERIOS DE IDENTIFICACION

	Trr QF/DC	Trr DC-200	Resp FID	Resp KCITD	PODRIA SER	VALOR "p"	PRUEBAS	RESULTADO
1° ELUATO	0,21	0,18	+	-	-	-	-	¿
	0,45	0,39	-	-	α-HCH	-	Saponificación (KOH)	α-HCH
	0,57	0,47	+	-	Lindano	0,46	Saponificación (KOH)	Lindano + Impureza (eter)
	0,68	0,59	+	-	-	-	-	Coextractivo natural
	1	1	-	-	Aldrin	0,77	Epoxidación (paracético)	Aldrin
	1,19	1,19	+	-	-	-	-	Coextractivo natural
	1,52	1,54	-	-	-	-	-	Coextractivo natural
	1,85	1,82	-	-	pp'DDE	0,73	Oxidac. (Se. erg mico y rad. UV)	pp'DDE + PCB
	2,48	2,46	-	-	op'DDT	0,74	Saponificación (KOH)	op'DDT
	3,15	3,03	-	-	pp'DDT	0,65	Saponificación (KOH)	pp'DDT + PCB
2° ELUATO	3,85	3,58	-	-	-	-	-	Coextractivo natural
	0,82	0,63	+	-	-	-	-	Impureza (eter)
	1,12	0,86	+	-	-	-	-	Impureza (eter)
	2,07	1,84	-	-	Dieldrin	0,59	Clorhidrina con peracético	Dieldrin
	-	4,5	-	-	-	-	-	Coextractivo natural.

CUADRO X

REPOLLO

CRITERIOS DE IDENTIFICACION

	Trr QF/DC	Trr GC-200	Resp FID	Resp KC1TD	PODRIA SER	VALOR "p"	PRUEBAS	RESULTADO
1° ELUATO	0,21	0,18	+	-	-	-	-	¿
	0,45	0,38	+	-	α-HCH	-	Saponificación (KOH)	α-HCH
	0,56	0,46	-	-	Lindano	0,46	Saponificación (KOH)	Lindano
	0,65	0,64	-	-	-	-	-	Coextractivo natural
	0,93	0,87	+	-	-	-	-	Coextractivo natural
	1,85	1,83	-	-	pp'DDE	0,73	Oxid.(ác.cro- mico) y rad.UV	pp'DDE
	2,48	2,44	-	-	op'DDT	0,74	Saponificación (KOH)	op'DDT
	3,15	3,04	-	-	pp'DDT	0,65	Saponificación (KOH)	pp'DDT+PCB
2° ELUATO	0,82	0,61	+	-	-	-	-	Impureza(eter)
	1,08	0,85	-	-	-	-	-	Impureza(eter)
	1,52	1,84	-	-	-	-	-	Coextractivo natural.

CUADRO XI

G R E L O S

CRITERIOS DE IDENTIFICACION

	Trr OF/DC	Trr DC-200	Resp FID	Resp KC1TD	PODRIA SER	VALOR "p"	PRUEBAS	RESULTADO
1° ELUATO	0,21	0,18	+	-	-	-	-	?
	0,45	0,39	-	-	α-HCH	-	Saponificación (KOH)	α-HCH
	0,57	0,47	-	-	Lindano	0,46	Saponif.-KOH	Lindano
	0,65	0,65	-	-	-	-	-	Coextractivo natural
	0,99	0,85	+	-	-	-	-	Coextractivo natural
	1,32	1,09	-	-	-	-	-	Coextractivo natural
	1,85	1,82	-	-	pp'DDE	0,73	Oxidación (ác. crómico) y UV	pp'DDE + PCB
	2,48	2,45	-	-	op'DDT	0,74	Saponif.-KOH	op'DDT
	3,15	3,03	-	-	pp'DDT	0,65	Saponif.-KOH	pp'DDT + PCB
2° ELUATO	0,82	0,63	+	-	-	-	-	Impureza(eter)
	1,10	0,86	+	-	-	-	-	Impureza(eter)
	1,30	2,99	-	-	-	-	-	Coextractivo natural.

CUADRO XII

P A T A T A S

CRITERIOS DE IDENTIFICACION

	Trr QF/DC	Trr DC-200	Resp FID	Pesp KC1TD	PODRIA SER	VALOR "p"	PRUEBAS	RESULTADO
1° ELUATO	0,20	0,15	+	-	-	-	-	Coextractivo natural
	0,45	0,38	+	-	α -HCH	-	Saponificación (KOH)	α -HCH
	0,56	0,47	-	-	Lindano	0,46	Saponif.-KOH	Lindano
	1,87	1,82	-	-	pp'DDE	0,73	Oxidación cró mica y rad.UV	pp'DDE + PCB
	2,48	2,43	-	-	op'DDT	0,74	Saponif.-KOH	op'DDT
	3,15	3,03	-	-	pp'DDT	0,65	Saponif.-KOH	pp'DDT
2° ELUATO	0,82	0,62	-	-	-	-	-	Impureza(eter)
	1,10	0,85	+	-	-	-	-	Impureza(eter)
	1,80	0,72	-	-	-	-	-	Coextractivo natural.

CUADRO XIII

ALUBIAS

CRITERIOS DE IDENTIFICACION

	Trr QF/DC	Trr DC-200	Resp FID	Resp KC1TD	PODRIA SER	VALOR "p"	PRUEBAS	RESULTADO
1° ELUATO	0,21	0,18	+	-	-	-	-	L
	0,45	0,38	+	-	α-HCH	-	Saponificación (KOH)	α-HCH
	0,56	0,45	-	-	Lindano	0,46	Saponif.-KOH	Lindano
	0,61	0,64	-	-	-	-	-	Coextractivo natural
	1,02	0,87	+	-	-	-	-	Coextractivo natural
	1,65	1,29	-	-	-	-	-	Coextractivo natural
	1,85	1,83	-	-	pp'DDE	0,73	Oxidación cró- mica y rad.UV	pp'DDE + PCB
	2,48	2,44	-	-	op'DDT	0,74	Saponif.-KOH	op'DDT
	3,15	3,04	-	-	pp'DDT	0,65	Saponif.-KOH	pp'DDT
2° ELUATO	0,82	0,63	+	-	-	-	-	Impureza(eter)
	1,10	0,85	+	-	-	-	-	Impureza(eter)

CUADRO XIV

M A I Z

CRITERIOS DE IDENTIFICACION

	Trr QF/DC	Trr DC-200	Resp FID	Resp KC1TD	PODRIA SER	VALOR "p"	PRUEBAS	RESULTADO
1° ELUATO	3,15	3,03	-	-	pp'DDT	0,65	Saponificación (KOH)	pp'DDT
	0,21	0,18	-	-	-	-	-	i
	1,45	0,38	-	-	α-RCH	-	Saponificación (KOH)	α-RCH
	0,57	0,47	-	-	Lindano	0,46	Saponificación (KOH)	Lindano
	1,85	1,82	-	-	pp'DDE	0,73	Oxidación cró- mica. Radia.UV	pp'DDE
	2,48	2,46	-	-	op'DDT	0,74	Saponificación (KOH)	op'DDT
2° ELUATO	0,82	0,63	+	-	-	-	-	Impureza (eter)
	1,12	0,86	+	-	-	-	-	Impurezas (eter)

CUADRO XV

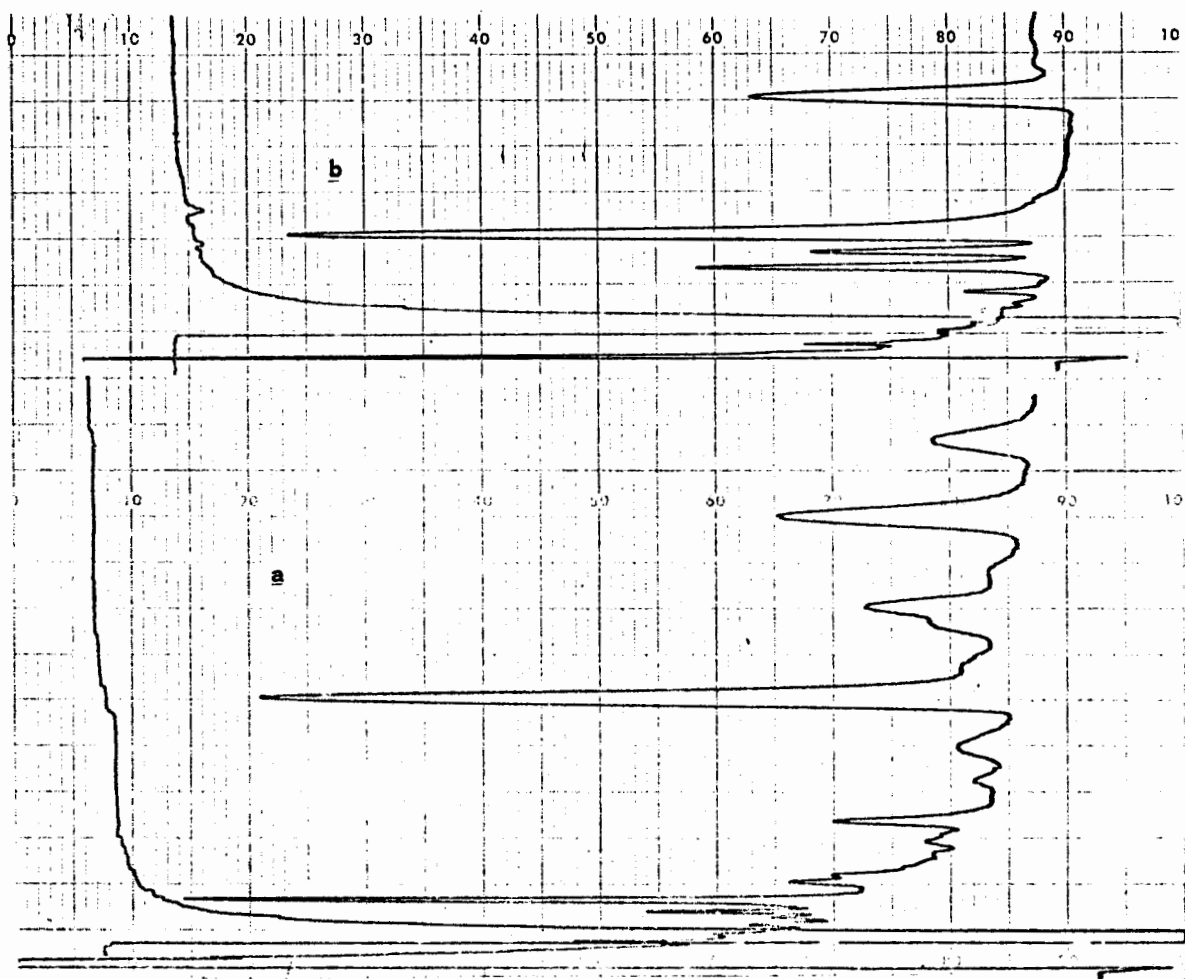


FIGURA 16.- 1°(a) y 2°(b) Eluatos en DC-200 (EC/FID) de muestras de suelos

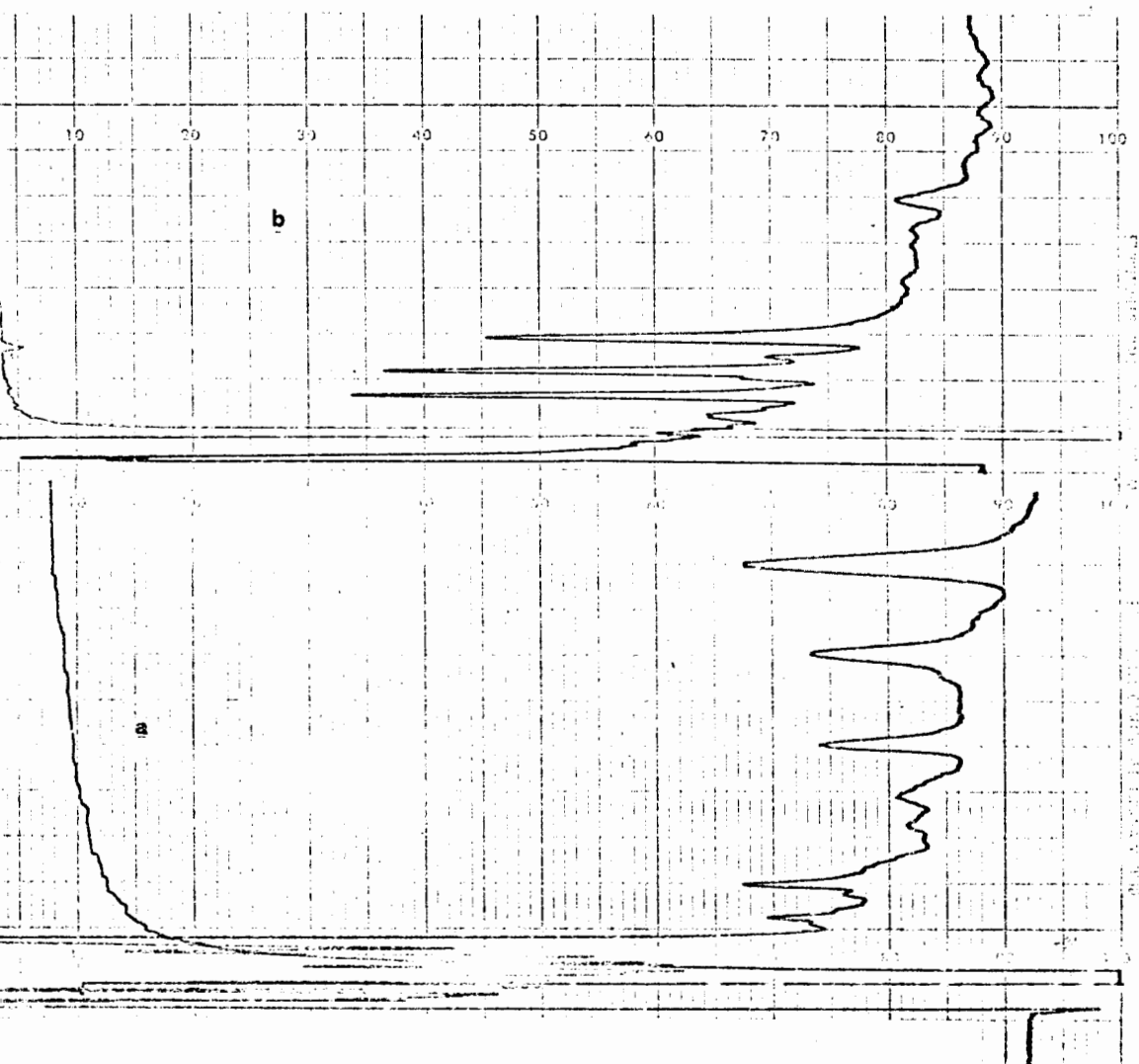


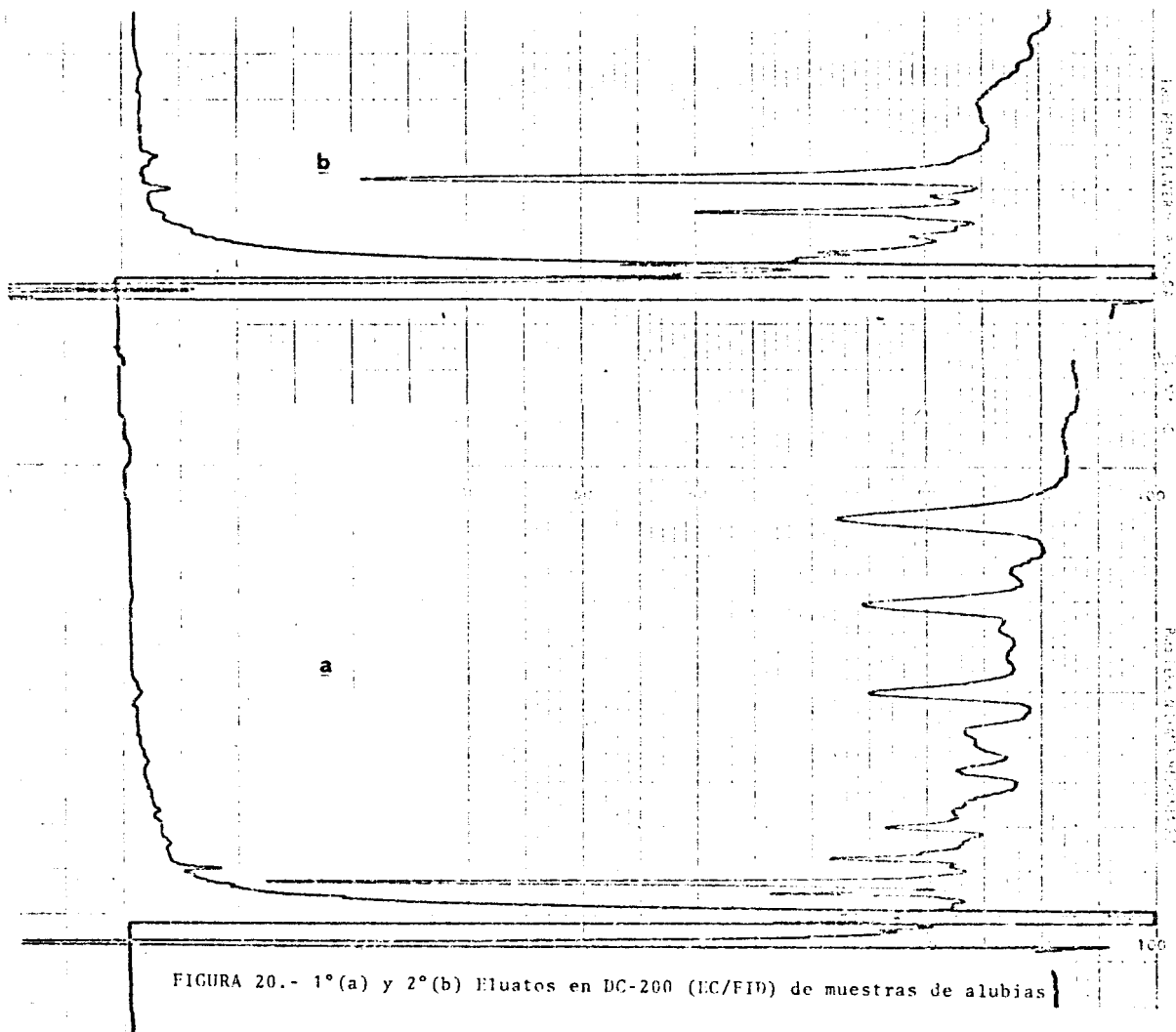
FIGURA 17.- 1°(a) y 2°(b) Eluatos en DC-200 (EC/FID) de muestras de repollo



FIGURA 18.- 1°(a) y 2°(b) Eluatos en DC-200 (EC/FID) de muestras de grelos



FIGURA 19.- 1º(a) y 2º(b) Eluates en DC-200 (EC/FID) de muestras de patata



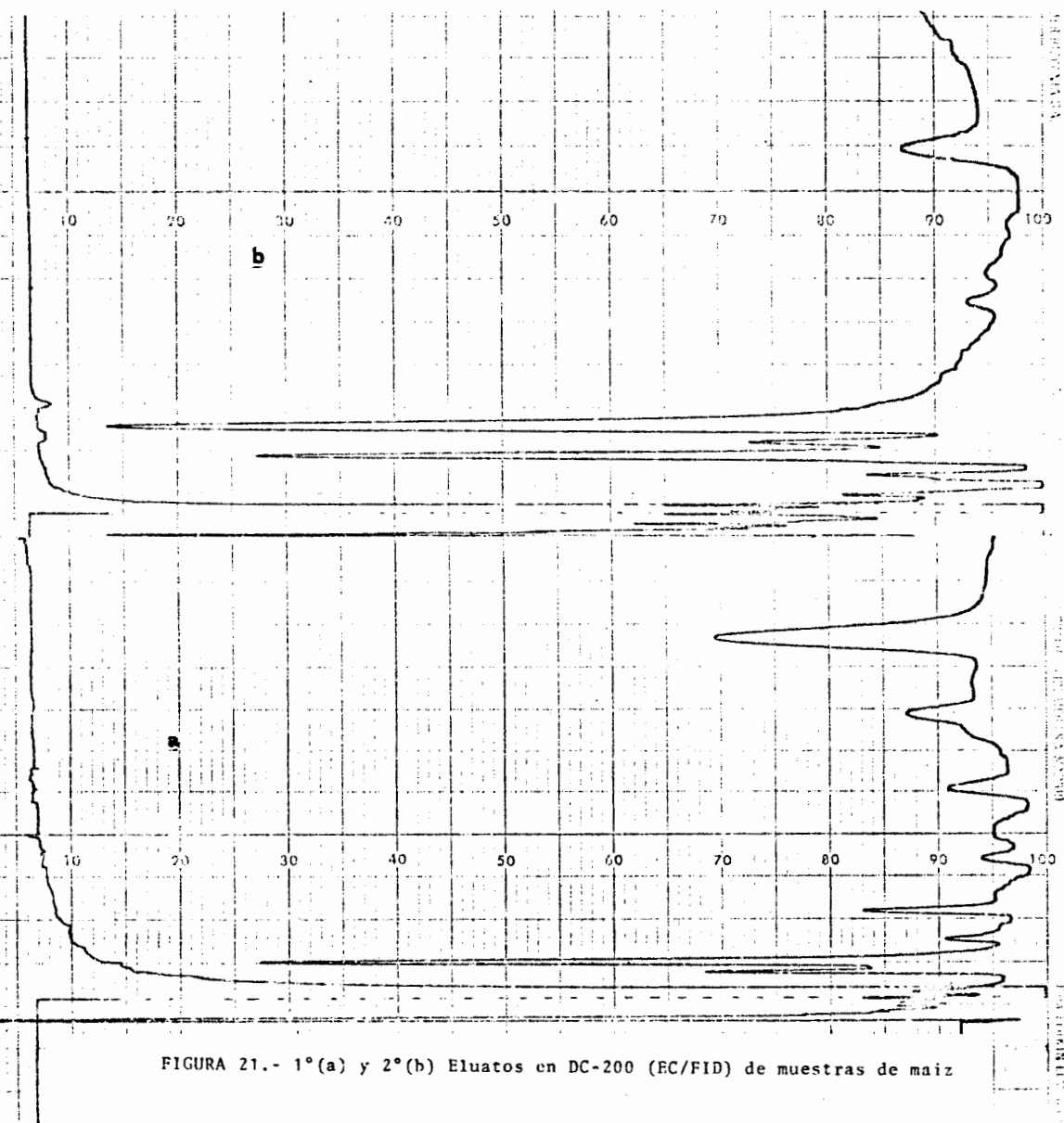


FIGURA 21.- 1°(a) y 2°(b) Eluatos en DC-200 (EC/FID) de muestras de maiz

de deducir que algunos picos no son pesticidas y que otros es bastante probable que lo sean. En estos últimos se determina su valor "p" e incluso es necesario recurrir a las pruebas de confirmación en los siguientes casos:

- En algunos casos se detectó Aldrín o Dieldrín y por la extrañeza de su procedencia, dichas muestras fueron sometidas a los tratamientos ya descritos para su confirmación (fig. 14 y 15).
- En todas las muestras se ha hecho el tratamiento alcalino y oxidación crómica, pruebas con las que permanecen inalterables los PCB y son profundamente modificados los pesticidas.

Mediante el tratamiento alcalino (Fig. 12), hemos llegado a la conclusión de que en algunas muestras de suelo, repollo y grelos, existe PCB coincidente con el pp'DDT (figs. 22b; 23 b y 24b) mientras que en las de patata, alubia y maíz (fig. 25b; 26b y 27b) carecían de este PCB. No obstante, en las muestras que lo contenían nunca llegó a ser un tercio del total y fué descontado en el valor atribuído al pesticida.

Mediante el tratamiento con el ácido crómico (Fig. 13), hemos comprobado que a excepción del repollo y maíz (Fig. 23c y 27c) las demás

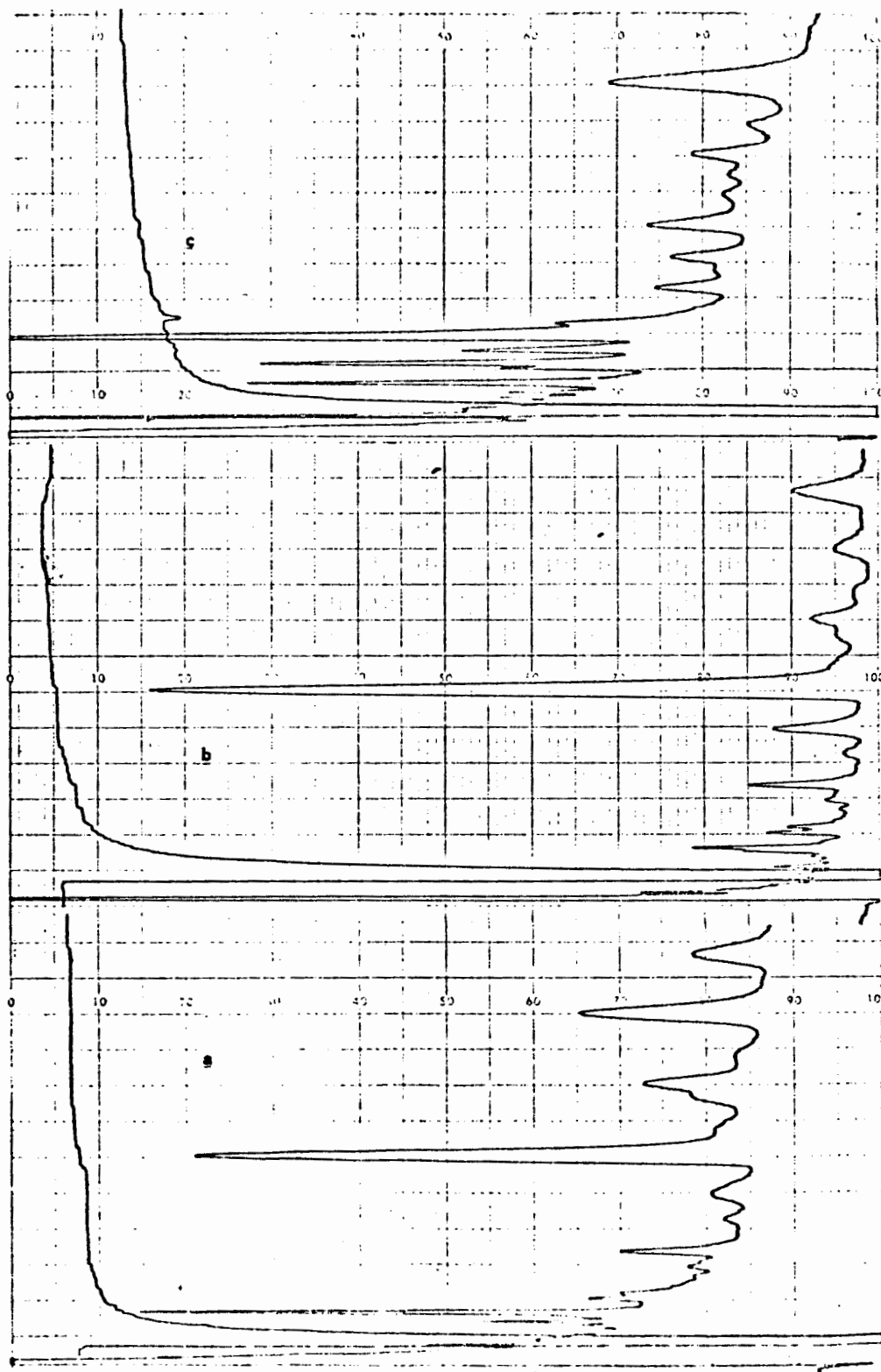


FIGURA 22. a (suelo); b (suelo-PR); c (suelo-ác. crómico)

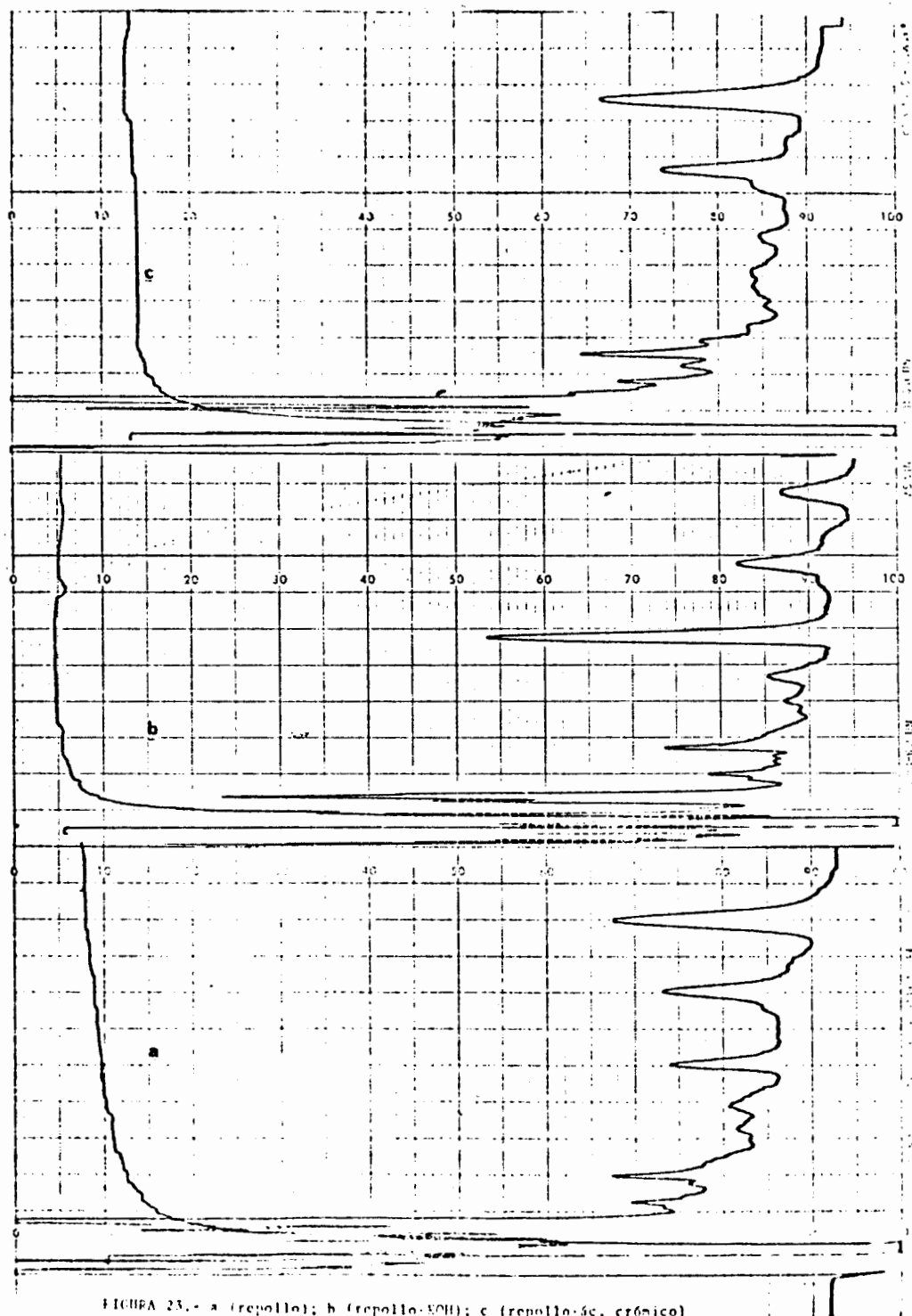


FIGURA 23.- a (repollo); b (repollo-KOH); c (repollo-5c, crómico)

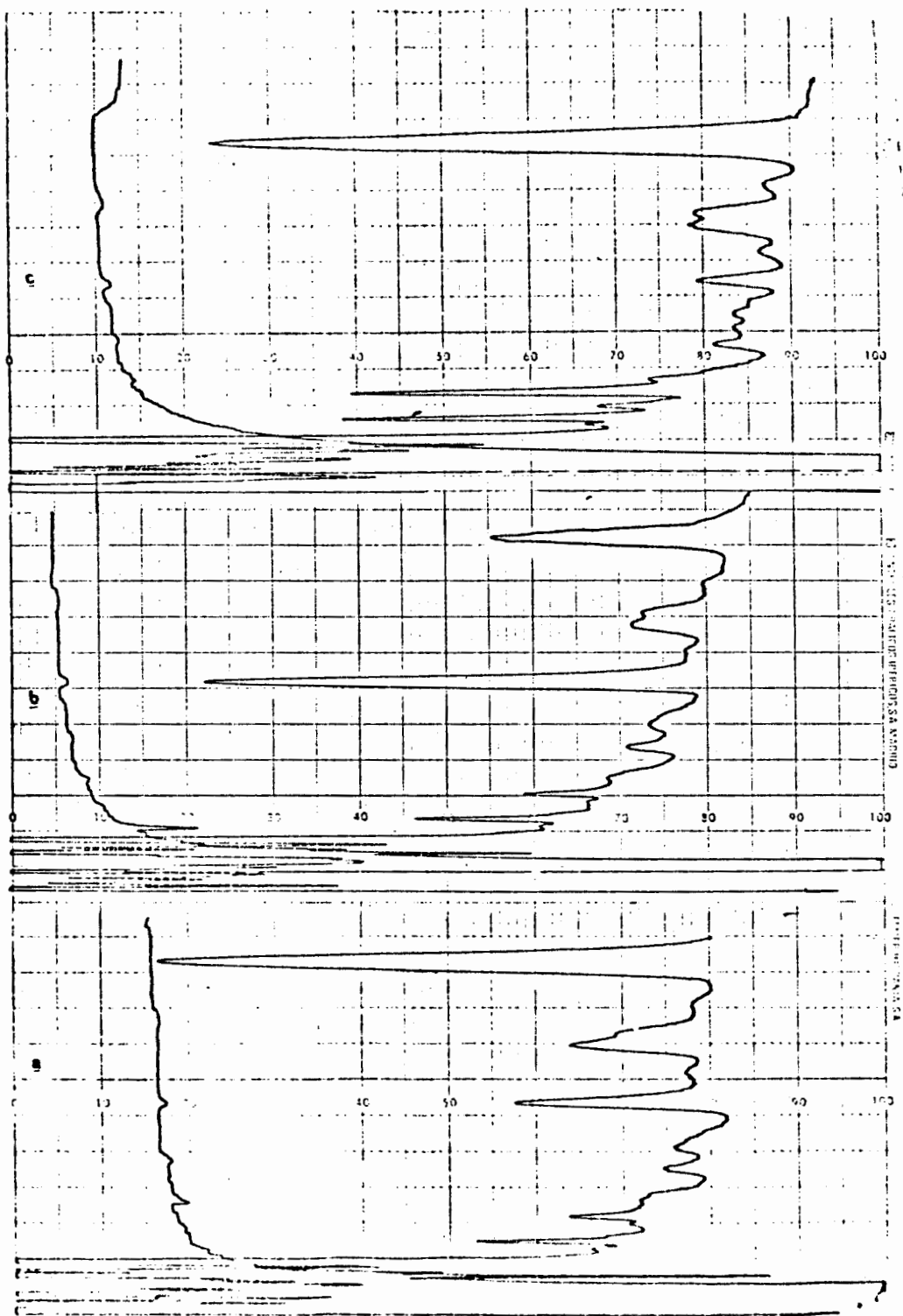


FIGURA 24.- a (preloz); b (preloz-KOH); c (preloz- H_2O , crômico)

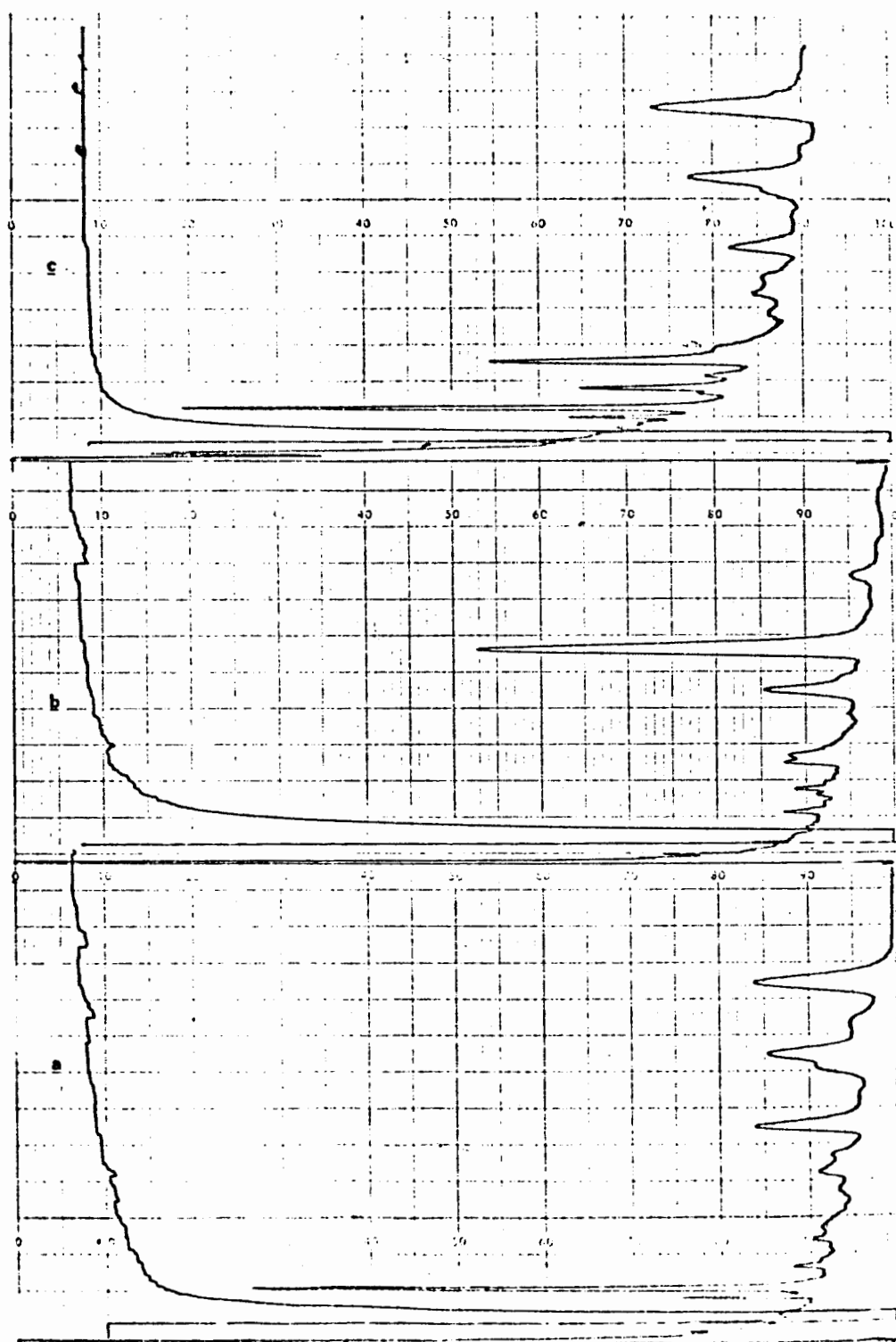


FIGURA 25.- a (patatas), b (patatas-FOD); c (patatas - ác. crónico)

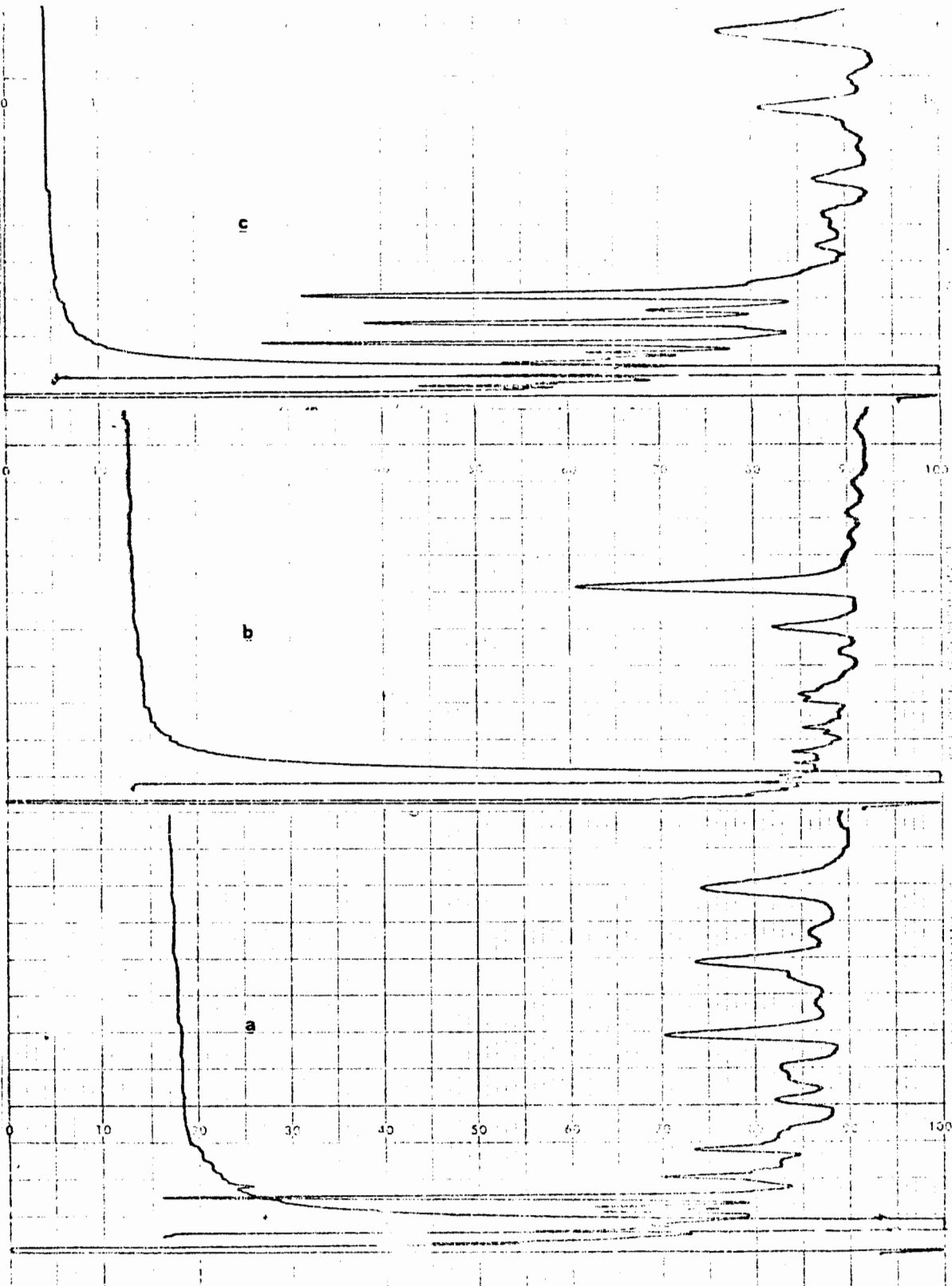


FIGURA 26.- a (alubias); b (alubias - KOH); c (alubias-ác. crómico)

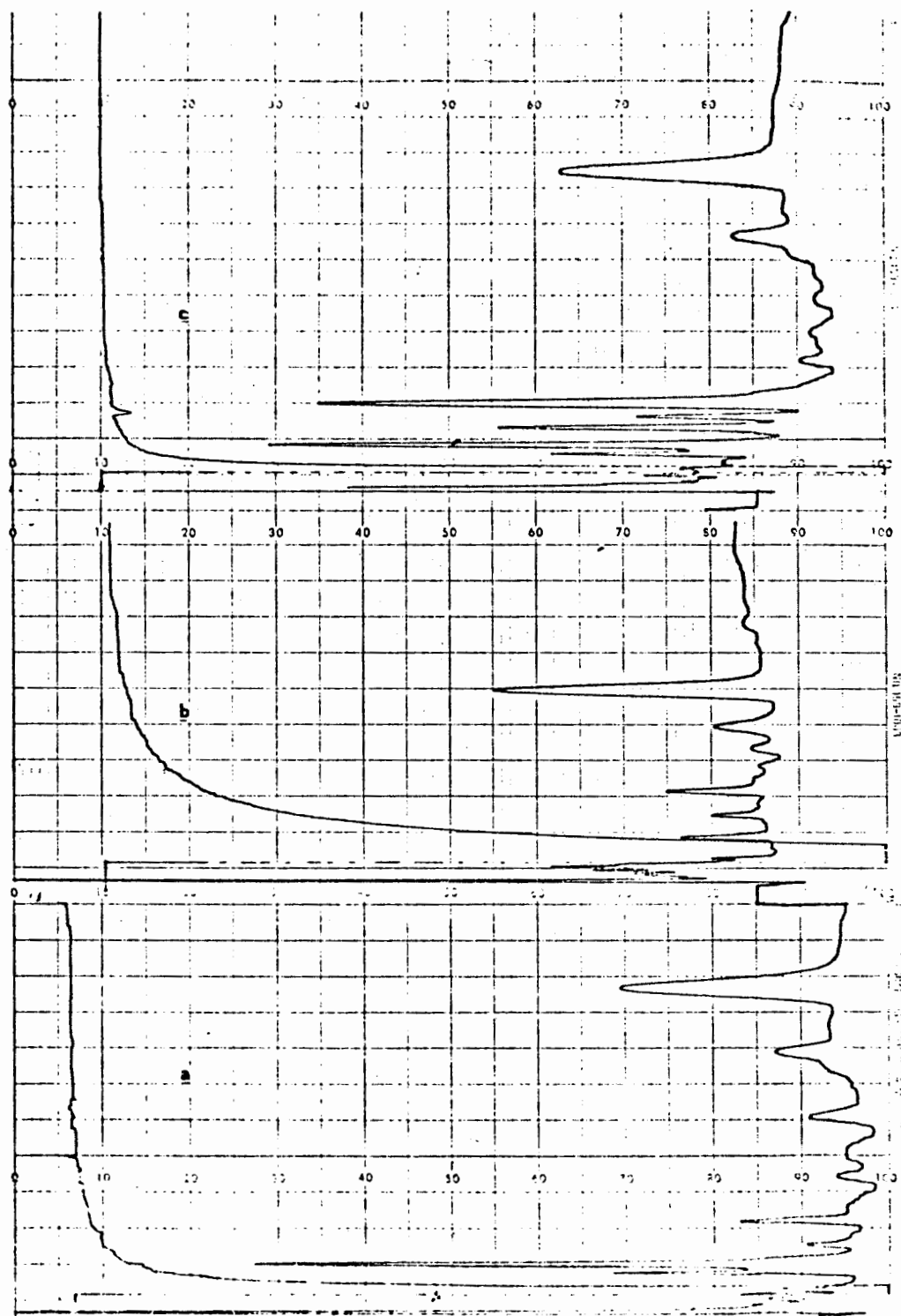


FIGURA 27.- a (maiz); b (maiz-KOH); c (maiz 40. crómico).

muestras contenían PCB's coincidente con el pp'-DDE aunque en cantidades que no sobrepasaban tampoco 1/3 del pico total (Fig. 22c; 24c; 25c; 26c).

- En algunas muestras de suelo se presentaron respuestas en el detector de llama de hidrógeno sin correspondencia en el detector de captura de electrones (fig. 28). La naturaleza de la sustancia productora de estos picos que parecían por sus tiempos de retención corresponder a la serie homóloga de hidrocarburos (el log. del Tr esta en función lineal con el n° de átomos de carbón) fué confirmada por comparación con un cromatograma de fuel-oil (Fig. 30).

A la vista de los datos de los cuadros citados, vemos que entre los picos no identificados como pesticidas hay unos que se repiten en todos y que podemos considerar, como se ha comprobado posteriormente, procedentes de reactivos.

Entre los que no se repiten, observando todos los cromatogramas de un mismo tipo de muestra, hemos constatado que algunos picos de los no identificados con pesticidas eran también repetibles, además de los procedentes de reactivos. A esto les hemos denominado coextractivos naturales ya que los hemos encontrado en todas las muestras.

Los reactivos, como ya se ha dicho, son purificados

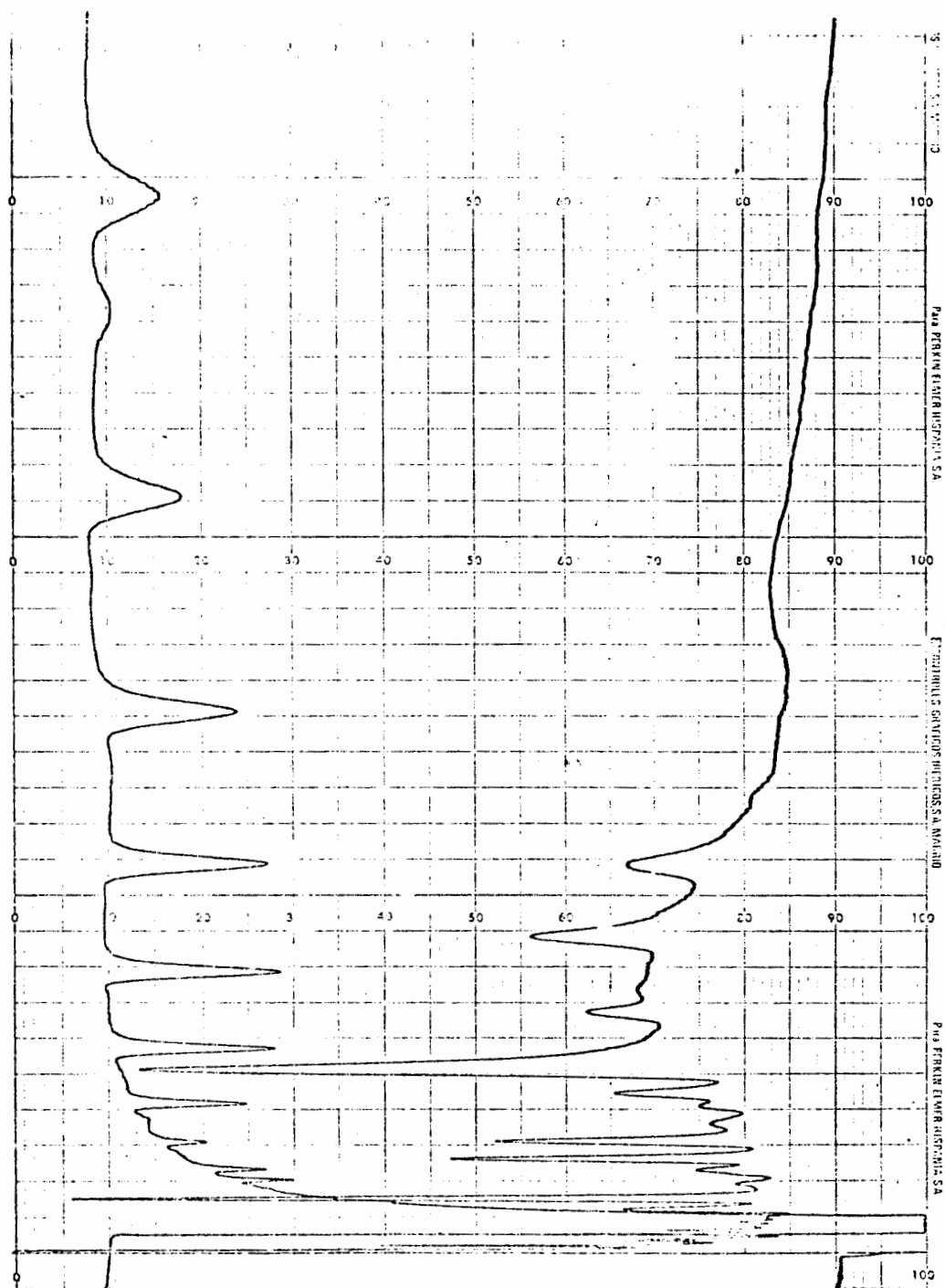


FIGURA 28.- Muestra con respuesta en llana debido a hidrocarburos
(SB-5-72- saponificada)

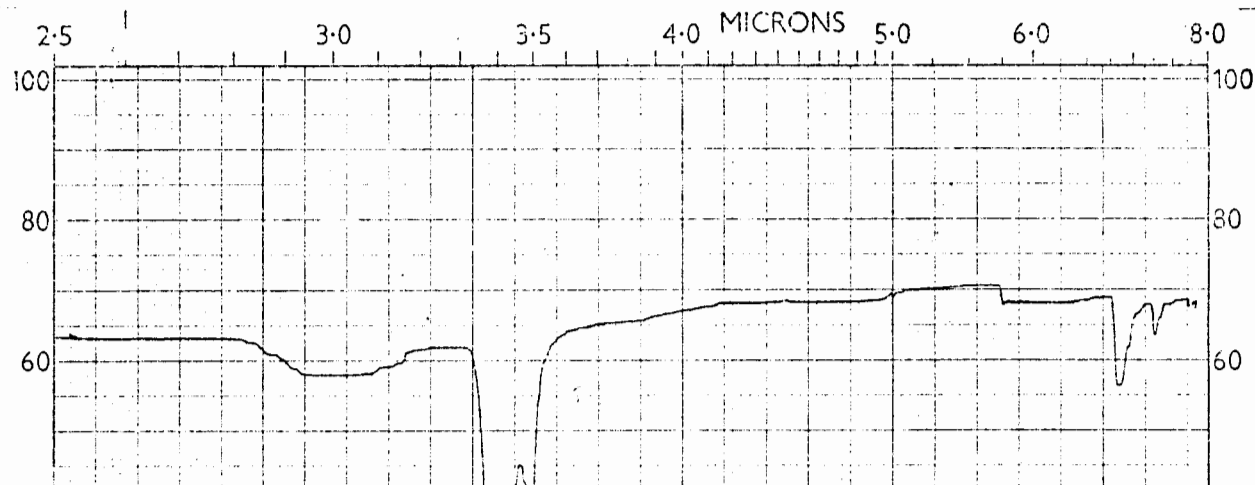


FIGURA 29.- Espectro de I.R. c
(Hidrocarburos)

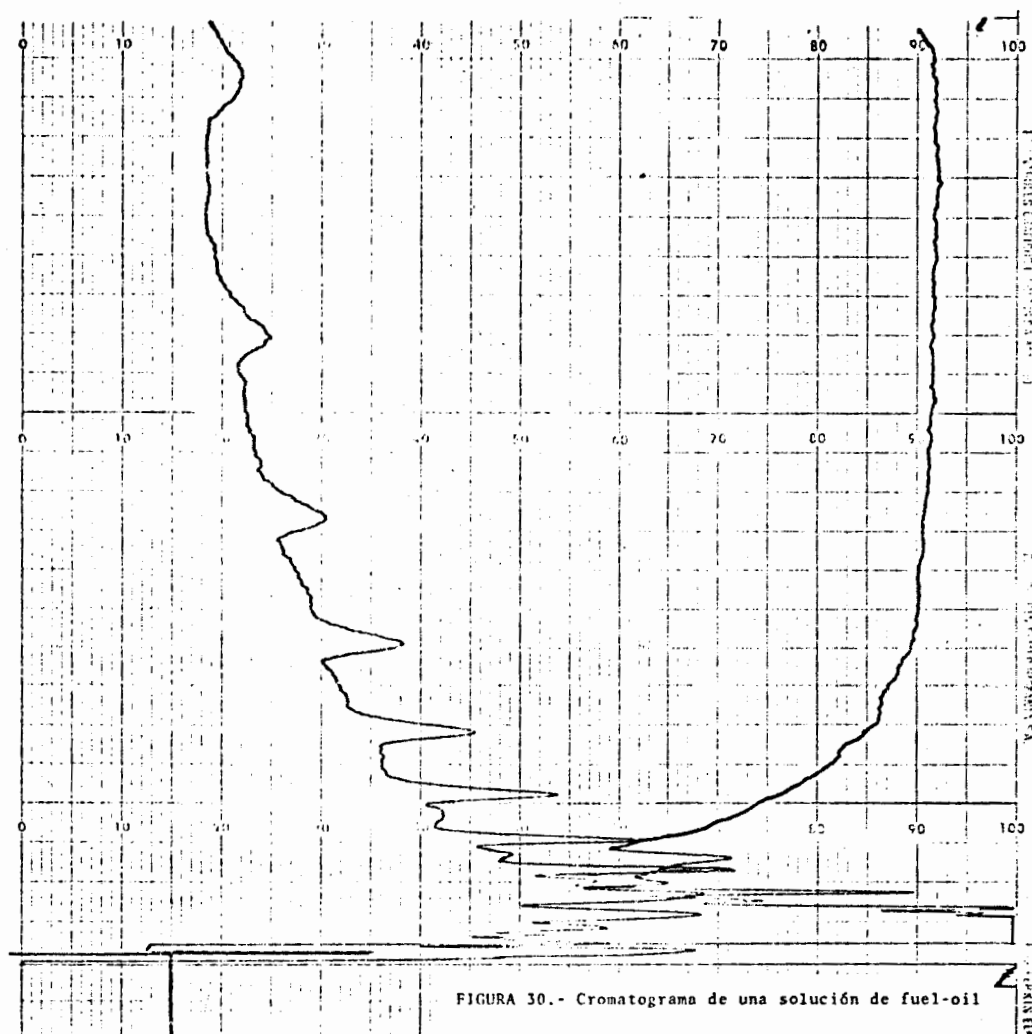


FIGURA 30.- Cromatograma de una solución de fuel-oil

y comprobados a ntes de su uso y solo el eter de petróleo ha resultado difícil de purificar, para el nivel de sensibilidad requerido. Debido a esto, con el objeto de saber que picos de las muestras podian proceder del eter de petróleo, hemos concentrado 200 ml. del mismo a 1 ml. y este se ha sometido al proceso de purificación sobre florisil, inyectando posteriormente los dos eluatos en ambas columnas gas-cromatográficas con la obtención de los siguientes datos:

	DC-200 (Tr)	QF 1/DC-200 (Tr)
1° E	0,47	0,56
2° E	0,62; 0,85	0,82; 1,10

En casi todos los cromatogramas de todos los tipos de muestras se hallan presentes cada uno de estos picos. Sin embargo ni su presencia ni su proporción son constantes como tampoco lo son cuando se trata de pruebas en blanco lo que hace pensar en la diferente composición del eter de petróleo.

Estas interferencias han sido confirmadas por sus tiempos de retención en dos columnas y por su valor "p".

Estas impurezas desaparecen al ser sometidas

das a la KOH metanólica, por lo que se aconseja efectuar la purificación del eter de petróleo, mediante saponificación previa a la destilación.

3.8.- ANALISIS CUANTITATIVO DEL EXTRACTO ETereo:

De los diferentes métodos citados para el análisis cuantitativo de residuos por GLC, dados los niveles de detección no todos tienen utilidad práctica y casi exclusivamente puede emplearse el método directo de la relación concentración/respuesta del detector.

Como es lógico, es imprescindible controlar perfectamente las diferentes condiciones que puedan afectar la exactitud de la medida por lo que es necesario considerar las siguientes circunstancias:

3.8.1.- Influencia del volumen inyectado:

La más elemental de estas condiciones es sin lugar a duda la forma de efectuar la inyección que puede dar lugar a grandes errores. Dicha operación se consigue hacer correctamente después de cierta experiencia y como indicábamos en otro lado, empleando a ser posible cantidades próximas a la mitad de la carga de la jeringa utilizada o a lo sumo entre 2 y 8 μ litros. Cuando después de 10 inyecciones repetidas, el coeficiente de variación por cien es inferior

al 5%, podran iniciarse las determinaciones.

3.8.2.- Zona de respuesta lineal del detector:

Otro aspecto ineludible de las determinaciones cuantitativas (en general en cualquier técnica analítica), es la comprobación de la proporcionalidad lineal entre la concentración de un determinado soluto en el detector y su correspondiente respuesta. Esta característica, en el caso del detector de captura de electrones es una zona muy limitada dentro del reducido campo de trabajo de la *corriente de fondo* del mismo.

Para el estudio de la proporcionalidad es conveniente construir las rectas de calibrado así como buscar su ecuación y coeficiente de correlación lineal "r". En el cuadro XVI pueden verse l a s rectas encontradas para lindano y DDT.

Siempre que la respuesta obtenida para la muestra caiga dentro de la zona lineal puede determinarse la concentración a partir de la ecuación de las rectas de calibrado. En ocasiones, la respuesta es superior o inferior y entonces

VALORES ENCONTRADOS PARA LA CURVA DE CALIBRADO DE LINDANO Y pp' DDT EN LAS CONDICIONES DE TRABAJO USUALES.

LINDANO		pp' DDT	
NANOGRAMOS	ALTURA (cm)	NANOGRAMOS	AREA (cm ²)
0,04	2,4	0,12	0,08
0,08	4,18	0,24	1,47
0,1	5,11	0,36	2,45
0,15	7,10	0,41	2,92
0,2	9,25	0,48	3,26
0,25	11,23	0,72	4,62
0,5	13,18	1,20	6,77
r = 0,9998		r = 0,9802	
Y = 0,87 + 41,37 X		Y = 0,11 + 5,88 X	

CUADRO XVI

es necesaria la comparación directa con un área lo más próxima posible, ocasionada por una cantidad conocida de pesticida patrón.

Por otra parte, incluso en pruebas de identificación como se ha indicado en la determinación del valor "p" es completamente necesario trabajar en esta zona de proporcionabilidad lineal para la obtención de valores correctos.

3.8.3.- Otros factores: temperatura, envejecimiento de la columna, etc...

Igualmente se hace necesario para la determinación cuantitativa, el mantenimiento estricto de temperaturas en el bloque de inyección, columna y detector así como el caudal de gas portador.

No obstante, el inevitable envejecimiento de la columna y la posible variación de respuesta en el detector de captura de electrones, obliga a inyectar entre las inyecciones de las muestras, algún valor de la recta de calibrado para comprobar si las condiciones de trabajo no han variado. En caso contrario, es necesario la construcción de nuevas rectas. Hay que puntuali

zar a este respecto que el detector no es muy variable en respuestas y que cuando se mantiene encendido día y noche los valores de calibrado pueden permanecer constantes durante semanas.

3.8.4.- Interferencias:

También debemos señalar que la interpretación cuantitativa de los cromatogramas, para cada pesticida detectado, puede ser problemática, pues ya hemos indicado lo complicado que resulta efectuar una confirmación en algunos de ellos dado que se pueden encontrar interferencias coincidentes (PCB, etc.) lo cual obliga a observar la muestra después de someterla a la saponificación y a la prueba del ácido crómico y establecer la concentración por las diferencias encontradas.

3.8.5.- Límites de detección: absolutos y en las muestras:

La respuesta de los diferentes detectores se halla condicionada por varios factores, dependientes unos de las condiciones de trabajo y otros de la cantidad de muestra empleada, volu-

men a que es concentrado el extracto, cantidad inyectada, divisor utilizado en el cromatógrafo, etc. por lo que parece lógico señalar, de un lado, la mínima cantidad detectable en el cromatógrafo y, de otro, el valor más bajo de apreciación con relación a la cantidad de muestra empleada.

En cuanto al primero de aquellos límites, debemos indicar que el detector de ionización de llama de hidrógeno no es posible utilizarlo en la detección de estos residuos y tan solo ha sido manejado al objeto de facilitar la interpretación de los cromatogramas. Además (vease 3.7.2) se necesitarían microgramos de un determinado pesticida para obtener respuesta en este detector, lo cual no es alcanzable a nivel de residuos, y aunque lo fuera, al utilizarlo simultáneamente con el detector de captura de electrones, este último sería sobresaturado por largo tiempo, perdiendo toda su estabilidad y validez. Así pues solo tiene interés el límite alcanzado con los otros detectores.

Con el de captura de electrones se logra poner de manifiesto 0,009 µg de lindano, en tanto que para el DDT, este valor es diez veces más alto. Los pesticidas fosforados ensayados,

se logran detectar por encima de 0,5 ng para Malatión y de 0,15 ng para Etión y Tritión (Cuadro XVII).

Con el detector termoiónico, los límites todavía son mucho más variables con las sustancias detectadas. Así el malatión se logra detectar con una cantidad 100 veces inferior a la requerida para el detector anterior, en tanto que el Etión y Tritión necesitan cantidades 50 y 25 veces inferiores a las de aquel detector (Cuadro VII).

Con aquellos límites pueden alcanzarse en las muestras los niveles de detección para el Lindano y DDT recogidos en el Cuadro XVII. También aparecen los límites que se encontraran para algunos fosforados empleados en la solución patrón, por lo que puede señalarse que estas sustancias no existen por encima de esos límites.

LIMITES DE DETECCION ABSOLUTOS Y RELATIVOS A LAS MUESTRAS
POR GLC

PESTICIDA	ABSOLUTOS EN GLC (ng)	RELATIVOS A LAS MUESTRAS EXPRESADOS EN ug/kg. DE MATERIA FRESCA					
		REFOLLO	GRELOS	PATATA	SUELO	ALNEIAS	MAIZ
LINDANO	0,009 (a)	0,03	0,03	0,03	0,06	0,06	0,06
pp'DDE	0,02 (a)	0,07	0,07	0,07	0,14	0,14	0,14
op'DDT	0,09 (a)	0,09	0,3	0,3	0,6	0,6	0,6
pp'DDT	0,09 (a)	0,3	0,3	0,3	0,6	0,6	0,6
MALATHION	0,02 (b)	0,07	0,07	0,07	0,14	0,14	0,14
ETION	0,009 (b)	0,03	0,03	0,03	0,06	0,06	0,06
TRITON	0,018 (b)	0,06	0,06	0,06	0,12	0,12	0,12

a = con ECD

b = con KC1TD

CUADRO XVII

3.9.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTICOLINESTERASICA DEL EXTRACTO ETereo:

3.9.1.- Fundamento:

La medida de la actividad anticolinesterásica, se basa en determinar la inhibición parcial de la actividad colinesterásica de una determinada fuente de enzima, por pesticidas organofosforados y/o carbamatos.

De los diferentes métodos propuestos en la literatura, se ha escogido el de valoración a pH constante, de suficiente precisión (134), y sensibilidad como se comprobará más adelante.

3.9.2.- Valoración potenciométrica de la actividad anticolinesterásica:

Como es sabido, la colinesterasa actúa sobre la acetilcolina liberando ácido acético que provoca una caída en el valor pH. Esta variación recogida por los electrodos, origina un impulso que motiva un vertido de sosa con igual velocidad que la de caída de pH, anulando por tanto su variación. De este modo, el registro de la adición de sosa frente al tiempo, proporciona

una gráfica (Fig. 31) que permite medir la actividad enzimática y expresarla en micromoles por centímetro cúbico de plasma y minuto.

La medida de la actividad anticolinesterásica, vendrá dada por la disminución de la actividad enzimática de la fuente de enzima, producida por el problema en condiciones determinadas.

Es pues necesario en esta medida, efectuar dos determinaciones de la actividad colinesterásica: una, la del ensayo en blanco, es decir, la debida a la fuente de enzima; y otra, la de esta misma fuente enzimática, pero en presencia del inhibidor (problema).

3.9.3.- Procedimiento:

Se dispone en una vasija termostatzada a 38°C análoga a la del montaje (Fig. 31) la mitad del extracto de diclorometano (que representa 1/4 de la muestra original) y se evapora el disolvente con ayuda de una corriente de nitrógeno. Se vierte a continuación 1 cm³ de plasma y 22 cm³ de agua destilada, manteniéndolos en agitación continua durante diez minutos y eliminando el CO₂ del aire con corriente de nitrógeno. Al cabo de este tiempo se añade 1 cm³ de la

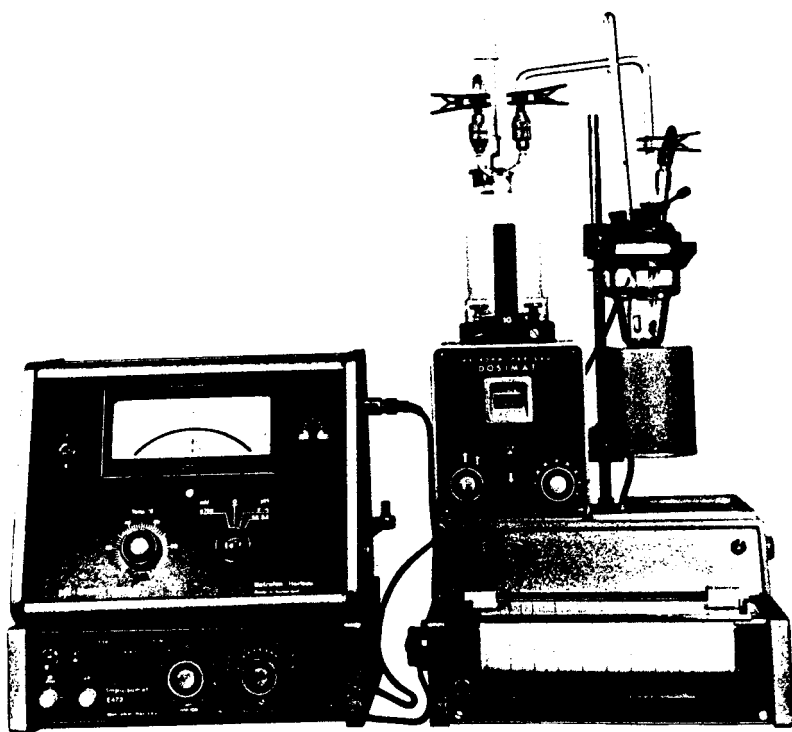


FIGURA 31.- Potenci6metro y vasija termostatzada

disolución de cloruro sódico al 21,6% y se ajusta el pH si fuese necesario a 7,40 por adición de sosa o clorhídrico. A continuación se añade 1 cm³ de la disolución de acetilcolina 0,25 M y se registra automáticamente el proceso de valoración, de tal forma que el pH se mantenga en 7,40 \pm 0,02.

Las condiciones del aparato de valoración han sido las siguientes:

POTENCIOMETRO: $t^a = 38^{\circ}\text{C}$
pH = 7,40

IMPULSOMAT: pH-mVx100 = en posición -1
dE/dVol = determinada experimentalmente observando que no hay variación en el pH superior a $\pm 0,02$
 ΔE = determinada experimentalmente en cada caso.

DOSIMAT: Bureta de 1 cm³
Velocidad de bureta = máxima

REGISTRADOR: Velocidad del papel de registro
= 2 mm./min.

3.9.4.- Cálculos:

Teniendo en cuenta que el vertido de 1 cm³ de hidróxido sódico 0,1N tiene un recorrido en el papel de registro de 20 cm. en el sentido horizontal (20 cm. = 100 μ moles), cada cm. de abscisas (Fig. 31) se corresponderá con un vertido de 5 μ moles. Para un valor de ordenadas correspondiente a 5 minutos de registro (10 mm. del papel en el sentido vertical), la abscisa da directamente la actividad en μ moles/cm³/min. Para mayor exactitud en la medida, se pueden tomar dos centímetros en ordenadas y dividir por dos el valor encontrado en abscisas que igualmente dará la actividad colinesterásica en aquellas dimensiones.

La gráfica que se obtiene en la valoración se aproxima generalmente a una recta pero no sigue exactamente la función lineal. Con el objeto de obtener una actividad que sea la media de la habida a lo largo de la valoración, se dibuja una recta que se aproxime lo más posible a la curva de valoración (Fig. 32).

El % de inhibición, se establece según la ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \frac{(A_0 - A_1)}{A_0}$$

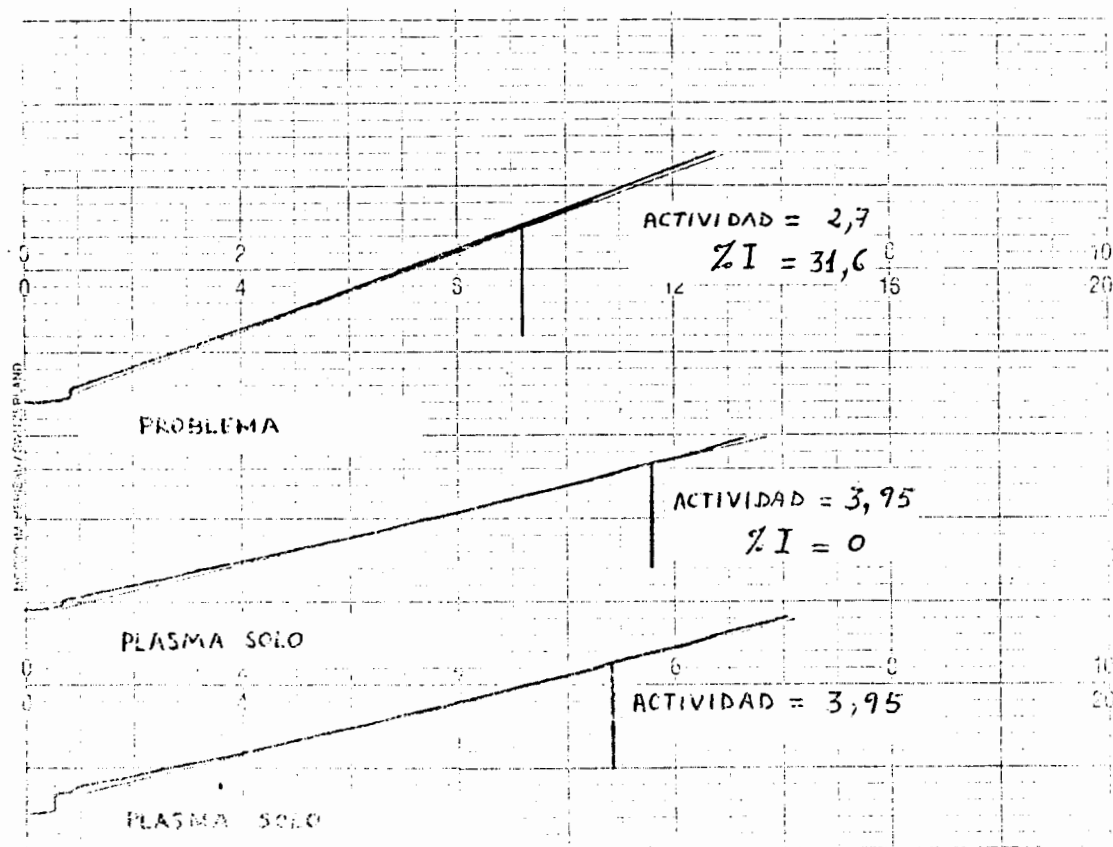


FIGURA 32.- Gráficas obtenidas en la valoración de la colinesterasa a pH constante.

en donde A_0 es la actividad enzimática del plasma en el ensayo en blanco y A_1 , es la actividad encontrada frente a un determinado problema.

3.9.5.- Límites de detección: absolutos y relativos a las muestras:

Mediante el procedimiento anteriormente descrito se han obtenido los límites de detección para el Dipterex y Sevín, así como para otros pesticidas, de la forma siguiente:

Una vez comprobada la precisión del método efectuando 10 medidas de la actividad normal de la fuente de enzima, plasma de caballo, se dispone 1 cm³ de plasma frente a cantidades ostensibles de pesticida (unos 20 µg), y siempre que se produzca inhibición, se repite la experiencia bajando la cantidad de pesticida hasta obtener una actividad que se corresponda con un 10% de inhibición, valor que hemos fijado como límite de detección (Cuadro XVIII).

Dado que para el Sevín y Dipterex, como puede verse más adelante (Cuadros XIX y XX), se han obtenido las ecuaciones de las rectas, estos valores límites pueden calcularse más exactamente a partir de estas, resultando ser de 1,5 y

LIMITES DE DETECCION EN LA VALORACION DE LA
CAPACIDAD ANTICOLINESTERASICA

		ACTIVIDAD ($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	% INHIBICION
SEVIN	Plasma	2,2	0
	" + 22 μg	0,3	86
	" + 12 "	0,6	72
	" + 5 "	1,3	41
	" + 4 "	1,4	37
	" + 3 "	1,6	27
	" + 2 "	1,8	19
	" + 1 "	2,0	9
MALATHION	Plasma	4,3	0
	" + 20 μg	3,36	22
	" + 15 "	3,57	17
	" + 10 "	3,75	12,7
	" + 8 "	3,85	10,4
PIRROLAN	" + 6 "	4,05	5,8
	Plasma	2,2	0
	" + 20 μg	0,0	100
	" + 10 "	0,4	82
	" + 5 "	0,6	72
	" + 2 "	1,0	55
	" + 1 "	1,8	19
DIFETEX	" + 0,5"	2,0	9
	Plasma	5,9	0
	+ 30 μg	2,38	59,6
	+ 15 "	3,95	33,0
	+ 10 "	4,8	18,6
	+ 5 "	4,9	17,0
	+ 2 "	5,42	8,1

CUADRO XVIII

RECUPERACION DEL SEVIN EN EL PROCESO DE EXTRACCION Y OBTENCION DEL EXTRACTO DE
DICHLOROMETANO

MUES- TRAS	CONC. (µg)	Log µg	% I	EQUACION RECTA	% RECUP. PARA 10 µg. SEVIN	% I DEL EXTRAC- TO EN Cl ₂ CH ₂
SUELO B	2,5	0,3979	42,5	$Y = 24,77 + 45' 11 X$ $\gamma = 0,9994$	87,52	24,77
	7,5	0,8751	65			
	12,5	1,0969	73,75			
REPOLLO	5	0,69	49,19	$Y = 23,6 + 37,54 X$ $\gamma = 0,9871$	72,83	23,6
	10	1 -	62,78			
	15	1,17	66,66			
CABELOS	5	0,69	44,6	$Y = 11,7 + 47,88 X$ $\gamma = 1,000$	92,89	11,7
	10	1 -	59,2			
	15	1,17	67,41			
PATATAS	5	0,69	60,8	$Y = 26,21 + 49,58 X$ $\gamma = 0,9998$	96,19	26,21
	10	1,00	76 -			
	15	1,17	84,4			
ALUBIAS	5	0,69	45 -	$Y = 14,49 + 44,66 X$ $\gamma = 0,9878$	86,55	14,49
	10	1 -	61,1			
	15	1,17	65,8			
MAIZ	-	0,69	40,64	$Y = 1,28 + 59,38 X$ $\gamma = 0,9948$	115,2	1,28
	7,5	0,87	49,67			
	10	1,00	58,70			
SEVIN	1,6	0,20	11,4	$Y = 0,6 + 51,54 X$ $\gamma = 0,9923$		
	4	0,60	29,1			
	6,4	0,80	37,9			
	8	0,90	45,5			
	10	1,00	54,3			
	15	1,17	60,0			

CUADRO XIX

RECUPERACION DEL DIPTEREX

MUES- TRAS	CONC. (µg)	LOG. µg	Z I	ECUACION RECTA	% RECUP. PARA 10 µg DIPTEREX	% I DE EX TRACTO EN Cl ₂ CH ₂
SUELO A	5	0,7	41,4	Y = 19,85 + 42,52 X r = 0,4527	87,36	19,85
	10	1,0	85,1			
	15	1,17	55,1			
REPOLLO	10	1,0	69,0	Y = 25,20 + 43,42 X r = 0,9940	89,21	25,20
	15	1,17	75,4			
	20	1,30	82,2			
GRELOS	5	0,7	56,04	Y = 23,71 + 46,06 X r = 0,9997	94,63	23,71
	10	1,0	77,21			
	20	1,30	83,9			
PATATAS	5	0,7	74,7	Y = 70,64 + 6,11 X r = 0,9339	12,55	70,64
	10	1,0	77,4			
	15	1,17	77,4			
ALUBIAS	5	0,7	37,8	Y = 21,71 + 26,07 X r = 0,7632	53,56	21,71
	10	1,0	53,78			
	15	1,17	48,4			
MAIZ	5	0,7	32,42	Y = 29,48 + 4,07 X r = 0,9790	8,36	29,48
	10	1,0	33,33			
	15	1,17	34,4			
DIPTEREX	2	0,30	8,1	Y = - 16,14 + 48,67 X r = 0,9460		
	10	1,0	18,6			
	15	1,17	33			
	30	1,47	59,6			
	45	1,65	67,4			
	60	1,77	75,9			

CUADRO XX

5,5 μ g. para Sevin y Dipterex respectivamente.

En relación con las muestras, los límites de detección, teniendo en cuenta que en general se usa para esta determinación la cuarta parte del peso inicialmente extraído, serán: para SEVIN y DIPTEREX de 0,12 y 0,44 ppm respectivamente en las muestras con poca humedad: suelos, alubias y maiz; y de 0,06 ppm de sevin y 0,22 ppm de dipterex en grelos, repollo y patatas.

Observaciones:

Las cantidades empleadas en estas determinaciones, y porcentajes de inhibición encontrados, permiten establecer curvas de calibrado fácilmente convertibles en rectas si se hace la representación semilogarítmica (fig. 33 a y b).

Para bajas concentraciones de inhibidor, existe una relación lineal entre estas y el porcentaje de inhibición.

También se ha podido observar que el % de inhibición obtenido para cantidades determinadas de pesticida es independiente de la actividad del plasma.

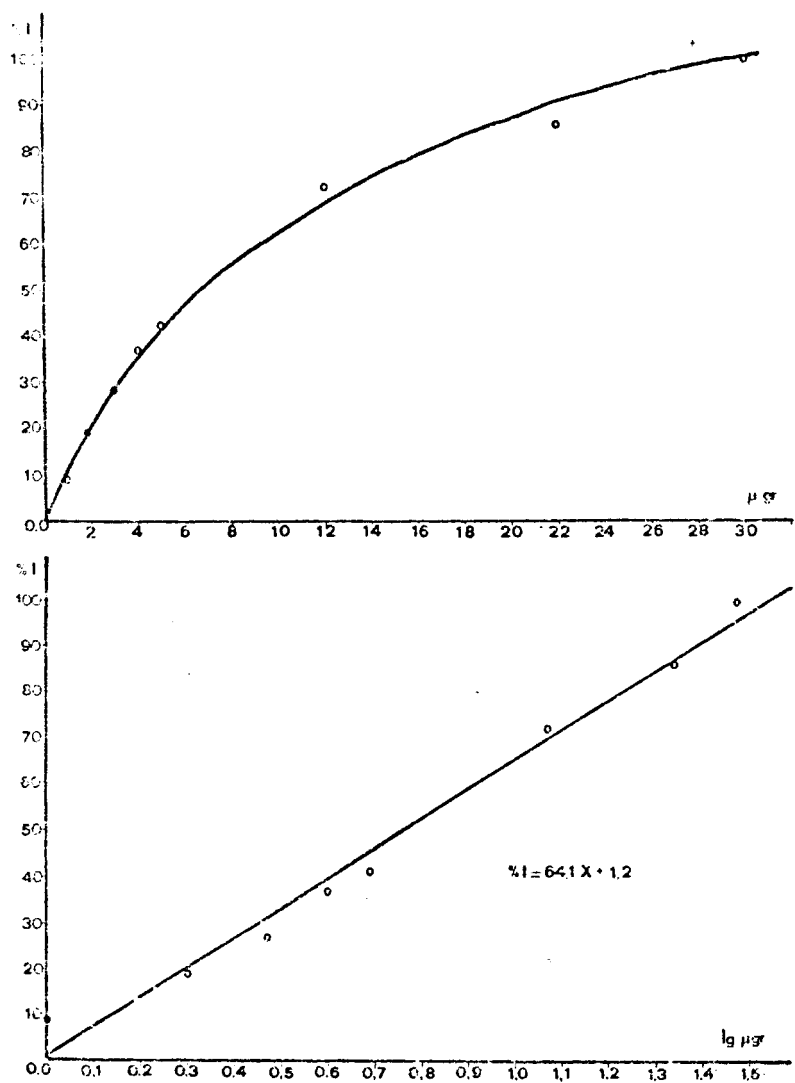


FIGURA 33.- Sevín a) $\mu g/\% I$
b) $Lg \mu g./\% I$

3.9.6.- Recuperación de DIPTEREX y SEVIN:

Como se ha indicado en otro lugar, los pesticidas aplicados a la parcela a lo largo del estudio han sido: Lindano, Sevín y Dipterex. Estos dos últimos no son termostables y por ello no se pueden determinar directamente mediante cromatografía de gases de multirresíduos, al menos en las condiciones habituales de 200°C en la columna, de ahí que se haya montado este procedimiento enzimático. En esta técnica, al igual que en la de GLC, es necesario conocer la recuperación que puede lograrse, por lo que las diferentes muestras se han cargado con cantidades de Dipterex y Sevín parecidas a las necesarias para establecer los límites de detección. Los resultados encontrados para Sevín y Dipterex en las diferentes muestras, que figuran en los cuadros XIX y XX y las representaciones gráficas de la figura 34 a y b, ponen de manifiesto lo siguiente:

- a) Algunas muestras al ser cargadas con pesticidas inhibidores producen al ser valoradas unas gráficas experimentales bastante curvas, por lo que el cálculo de actividad no puede hacerse de la forma explicada en 3.9.4. En estos casos se ha efectuado la medida de la ac-

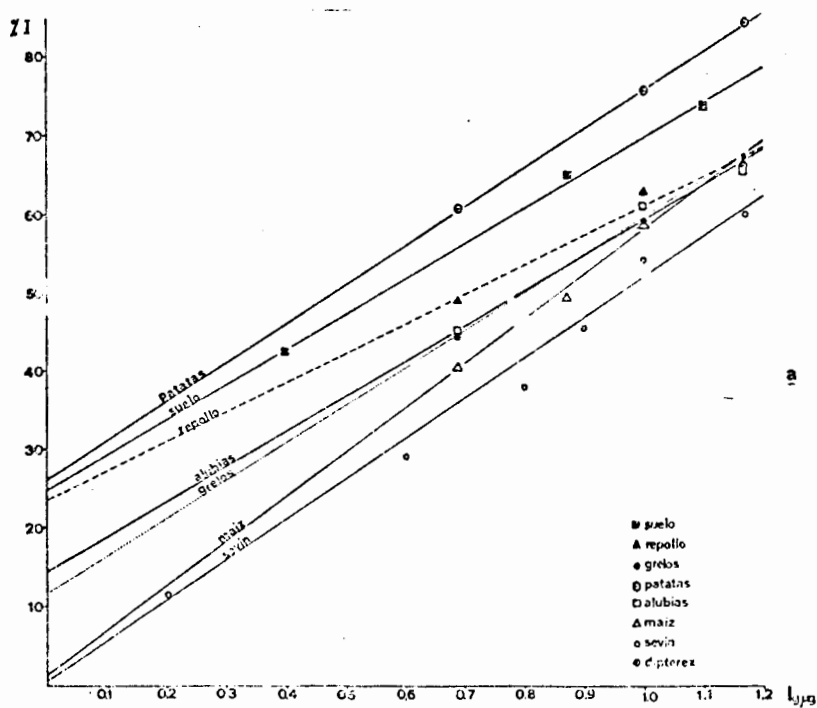
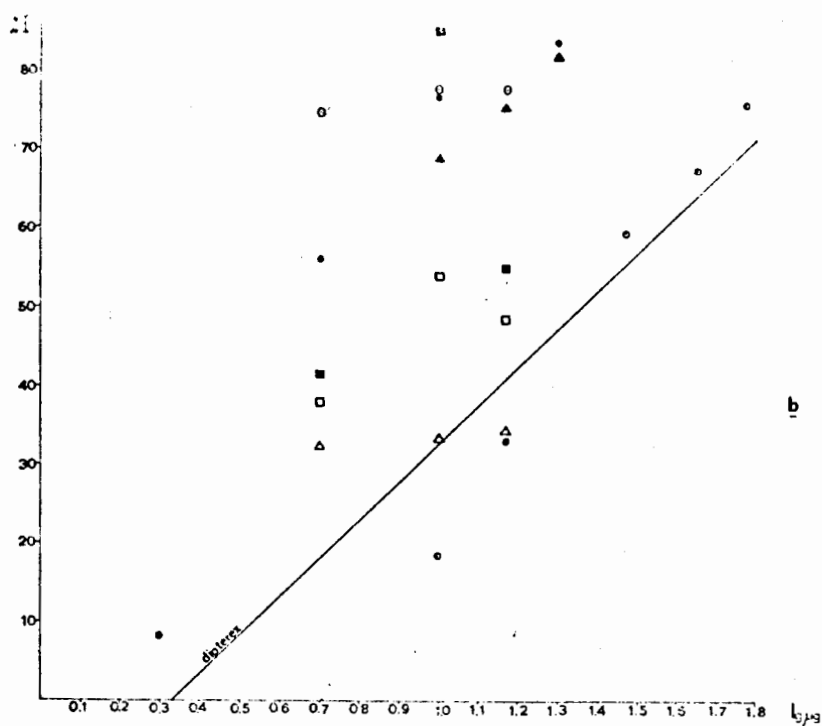


FIGURA 34.- a) Recuperaciones del Sevin en las distintas muestras ($\log \mu g / 5 l$).
b) Datos obtenidos en el Dipterec ($\log \mu g / 5 l$).

tividad colinesterásica considerando dos puntos definidos de dicha curva: el punto a los 5 minutos de valoración y el punto alcanzado a los 45 minutos. Esta forma de proceder parece lógica y sería la empleada de no disponerse de registrador.

- b) Las muestras sobrecargadas presentan mayor inhibición que el pesticida directamente, lo que hace pensar en una inhibición por parte de la muestra en sí. La necesidad de conocer esta, obliga a practicar al menos tres sobrecargas por muestra que permitan la construcción de la recta y obtención de la ordenada en el origen así como de su pendiente.
- c) En las rectas obtenidas para Sevín en las diferentes muestras, se puede observar un cierto paralelismo (pendientes muy parecidas) y sin embargo todas ellas cortan a la recta obtenida con el pesticida solo, por lo que se estima que la recuperación no es total.

Con la pendiente de estas rectas y la obtenida en el caso del pesticida solo, se puede calcular el porcentaje de recuperación por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rec} = \frac{100.b}{B}$$

en donde "b" es la pendiente de la recta obtenida con la muestra, y "B", la pendiente de la recta obtenida con los datos del pesticida solo. Este porcentaje viene a ser la recuperación que se obtendría practicando una sola sobrecarga de 10 µg. (ya que la pendiente es el valor de la inhibición debida a 10 µg. de pesticida). El cálculo de recuperación a partir de un solo dato podría hacerse conociendo la ordenada en el origen, es decir inhibición por parte de la muestra, pero aún así, en este caso concreto, es mejor tener en cuenta una recuperación media por lo que, la consideración de la pendiente de la recta es una forma representativa.

El estudio de recuperación hecho para estos dos pesticidas, pone de manifiesto el buen comportamiento del Sevín sometido a todo el proceso de extracción y análisis descritos, y los resultados por el contrario arbitrarios obtenidos para el dipterex con recuperaciones que van del 8 al 90%. Esto nos llevó a realizar estudios de estabilidad para ambos pesticidas.

3.9.7.- Estudio de la estabilidad del SEVIN y DIPTEREX:

Con este objeto se montaron experiencias para ambos, a temperatura ambiente y expuestas al aire y valorándose la actividad de dos cantidades distintas de cada uno de ellos, después de diferentes tiempos de permanencia en las mismas condiciones.

Los valores encontrados están recogidos en los cuadros XXI a y b. La observación de estos resultados permite concluir que el dipterex al cabo de tres días deja de presentar actividad inhibidora, en tanto que el Sevín solo presenta una pérdida de actividad del 8% en el transcurso de un mes.

Comprobadas las soluciones standard, se ha podido ver que la solución de 20 ppm de Sevín en acetona tuvo una pérdida de actividad del 20% en tres meses (compárese, fig. 33 b v 34a). La solución de 20 ppm de dipterex en diclorometano, mantiene su actividad a lo largo de este tiempo por lo que parece que la variación de comportamiento con las muestras sea debido:

- 1°.- A los distintos tiempos necesarios para lograr la concentración de los extractos, du-

CUADRO XXI

a) SEVIN (PERDIDA DE ACTIVIDAD)

kg.	Horas	% I	kg.	Horas	% I
4	1	32	8	1	44,35
4	24	23	8	24	39,74
4	48	23	8	52	40,31
4	78	21,3	8	78	45,9
4	97	22,6	8	120	34
4	120	20,9	8	192	44,4
4	312	26,2	8	264	40,1
			8	312	40,9
			8	648	38,7

Línea de tendencia:

$$Y = 26,94 - 0,039 X$$

$$r = -0,49$$

Línea de tendencia:

$$Y = 41,77 - 0,0045 X$$

$$r = -0,25$$

b) DIPTEREX (PERDIDA DE ACTIVIDAD)

kg.	Horas	% I	kg.	Horas	% I
10	1,5	33,33	17,5	2,5	37,3
10	3,5	24,85	17,5	3,5	50
10	14,0	36,98	17,5	9,5	36,4
10	8	14,5	17,5	15,0	49,3
10	21	16,1	17,5	22	24,0
10	30	8,97	17,5	30	6,41
10	31	7,36	17,5	31	9,58
10	45	7,17	17,5	45	23
10	53	12,46	17,5	53	1,85
10	72	4,76	17,5	71	2,66
10	74	0	17,5	72	4,7
			17,5	74	0

Línea de tendencia:

$$Y = 26,60 - 0,35 X$$

$$r = -0,75$$

Línea de tendencia:

$$Y = 42,40 - 0,63 X$$

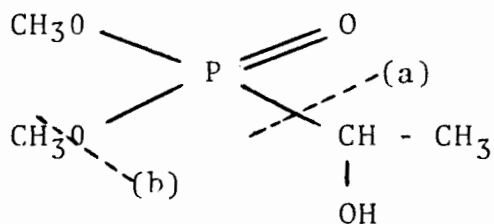
$$r = -0,84$$

rante los cuales se rozan las condiciones mantenidas en el estudio de estabilidad, y

2°.- a la permanencia a los siguientes pH distintos para cada muestra

Suelo	=	6,9
Repollo	=	4,0
Grelos	=	4,0
Patata	=	4,2
Alubia	=	4,9
Maíz	=	5,1

El pH, como se ha podido probar (137), es un factor de gran influencia en su estabilidad.



a pH ácido en medio acuoso la ruptura de la molécula dipterex, puede ser en (a) ó (a) dando en el primer caso el dimetil fosfato y en el segundo demetiltriclorfon, ambos compuestos carentes de actividad.

A pH = 7 ó ligeramente alcalino se forma

DDVP algo más activo que el dipterex, pero de vida media también corta en medio acuoso, transformándose en el dimetil fosfato.

Por ello el dipterex parcialmente inactivado en los pH ácidos de las muestras no da tampoco resultados satisfactorios en su valoración pues su vida media en las condiciones de trabajo (38' para el dipterex y 28' para el DDVP en soluciones de 100 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ a 37,5°C y en suero) es también corta en relación con el tiempo de 50' que dura una valoración completa. Aún cuando nuestras concentraciones eran muy inferiores a la de 100 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$, por lo cual pudiese ser que a estos niveles la vida media fuese algo mayor y la valoración pudiese lograrse, no ha sido así.

En resumen, este procedimiento permite conocer la presencia de sustancias inhibidoras en el extracto, siempre y cuando, esta no se degraden en el proceso analítico o de extracción lo cual es necesario comprobar.

Su aplicación al análisis cualitativo depende de sí es conocida o no la naturaleza del inhibidor. En un estudio como este en que se conocen los pesticidas aplicados, es más fácil la interpretación de los resultados; no obstante, en general se hace necesaria la cromatografía en

capa fina en la que además de identificarse los pesticidas que han presentado inhibición puedan detectarse metabolitos o productos de degradación de aquellos otros que se han alterado

3.10.- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA:

Aquellas muestras que presentaron actividad anticolinesterásica, se analizan con esta técnica.

La cromatografía en capa fina es desde sus orígenes aplicada a residuos de pesticidas fosforados y carbamatos por separado. Sin embargo, en la problemática que veníamos estudiando, interesa la determinación conjunta de ambos grupos y ello nos ha llevado a ensayar diferentes líquidos de desarrollo, adsorbentes, y métodos de visualización, hasta conseguir una detección simultánea y una sensibilidad próxima a la del método enzimático.

Principalmente se ha tratado de la determinación de Sevín y Dipterex, con la máxima sensibilidad.

3.10.1.- Procedimiento y resultados obtenidos con las soluciones patrón:

Después de repetidas pruebas, en las que se han utilizado Sevín y Dipterex, hemos llegado a obtener unas condiciones aceptables de separación y sensibilidad usando:

-adsorbente: óxido de aluminio con indicador de fluorescencia a 254 nm.

-líquido de desarrollo: cloroformo:n-hexano:acetona (1:1:1).

-reactivos de visualización: monoetanolamina, nitrato de plata en medio nítrico y observación a la luz ultravioleta.

Las placas, ya preparadas (cromatofolios) y almacenadas al resguardo de la luz y en desecador, se han utilizado sin activación previa.

Con las soluciones patrón de Sevín y Dipterex, se han hecho los depósitos de cantidades crecientes, utilizando pipetas automáticas y separándolos entre sí y del borde de la placa unos dos centímetros. Después de eliminar el disolvente de aquellas manchas, se introduce la placa en la cubeta de cromatografía, preparada una hora antes para que la atmósfera se halle saturada con

el vapor del eluyente, y se deja desarrollar unos 10 cm.

Para la visualización de los pesticidas, una vez seca la placa, se pulveriza con monoetanolamina y se calienta a 110°C durante 20 minutos al cabo de los cuales, se pueden observar las manchas amarillas del Sevín con $R_f = 0,78$, si este se encuentra en cantidad superior a los $3\text{ }\mu\text{g}$; si la cantidad es inferior, pero está por encima del límite de sensibilidad conseguido ($0,05\text{ }\mu\text{g}$), las manchas pueden verse por fluorescencia en la lámpara ultravioleta de 254 nm. A continuación, se pulveriza la placa con una disolución 0,1 molar de nitrato de plata y ácido nítrico ($d = 1,4$) en proporción 10:1, y se expone a la lámpara ultravioleta de 360 nm. a una distancia de dos centímetros durante tres o cuatro minutos, apareciendo en color negro con un $R_f = 0,24$, las manchas correspondientes al dilox siempre que se encuentre en cantidad superior al límite de sensibilidad de $0,1\text{ }\mu\text{g}$.

3.10.2.- Aplicación del método a las distintas muestras:

Al aplicar el método anteriormente descrito, a las distintas muestras, se presentan los

siguientes problemas:

1°.- Ya que el límite de sensibilidad alcanzado en el método enzimático es de 1,5 µg. para el Sevín y 5,5 µg. para el Dipterex, lo que se corresponde, al evaporar completamente los extractos (equivalentes a 12,5 y 25 g. según se trate de extractos de muestra con cierta proporción de agua o no), con límites de sensibilidad en estas de 0,12 y 0,06 ppm en el primer pesticida y 0,44, 0,22 ppm para el segundo, según las muestras, es necesario ver en este método a que volumen conviene concentrar los extractos para alcanzar límites de detección iguales o mejores.

Aunque los límites absolutos son más bajos en esta técnica, tiene la desventaja de no poder emplear la totalidad de la muestra, por lo que se hace necesario evaporar los extractos hasta 0,4 ml. y utilizar depósitos de 10 µl, se lograrían los siguientes límites teóricos de detección:

	Extractos (25 g.)	Extractos (12,5 g.)
SEVIN	0,08 ppm	0,16 ppm
DIPTEREX	0,16 "	0,32 "

límites más o menos de igual orden a los obtenidos en el método enzimático.

Sin embargo, extractos de muestras que no habían presentado actividad enzimática y concentrados hasta $0,4 \text{ cm}^3$ y cargados con las correspondientes cantidades ($2 \text{ } \mu\text{g.}$ de Sevín y $4 \text{ } \mu\text{g.}$ de Dipterex) no dan una clara respuesta como se podría esperar teóricamente. Es necesaria una concentración hasta $0,2 \text{ cm}^3$ para que extractos en esas mismas condiciones, presenten buena visualización de los pesticidas añadidos. Los límites absolutos reales pasan a ser dobles a los obtenidos con solución patrón es decir $0,1 \text{ } \mu\text{g.}$ para Sevín y $0,2 \text{ } \mu\text{g.}$ para el Dipterex. Como la concentración también es doble los límites relativos son los dichos anteriormente.

2°.- Dado que las muestras contienen Lindano y DDT es necesario saber si estos pesticidas pueden interferir con el Sevín o Dipterex para lo cual se han hecho pruebas utilizando las cantidades máximas en que estos pesticidas pueden encontrarse en los $0,2 \text{ cm}^3$ del extracto concentrado. Estas cantidades $1 \mu\text{g.}$

para el DDT y 0,22 μ g. para el Lindano siguiendo el método revelador descrito, dieron después de pulverizar con el nitrato de plata y exponer a la luz ultravioleta, manchas de Rf 0,84 y 0,81 respectivamente. No interfiere por tanto con el Sevín por su distinta visualización y Rf ni con el Dipterex por tener este un Rf muy diferente a estos valores.

3°.- Al hacer la cromatografía de los extractos, hay que tener en cuenta que estos llevan el polietilenglicol añadido en la concentración a vacío. Como este permanece en los depósitos aún después de evaporarse el resto del disolvente, actúa como un eluyente más en el desarrollo alterando los Rf. Hecho que se ha comprobado adicionando polioxientilenglicol 400 a los depósitos hechos con soluciones patrón.

Teniendo en cuenta que un depósito de 10 μ l. de muestra puede llevar hasta 0,25 mg. de POE, se han efectuado ensayos con cantidades de 0,5 mg. con el objeto de ver la máxima alteración de Rf. Los resultados obtenidos (fig. 35) fueron los siguientes:

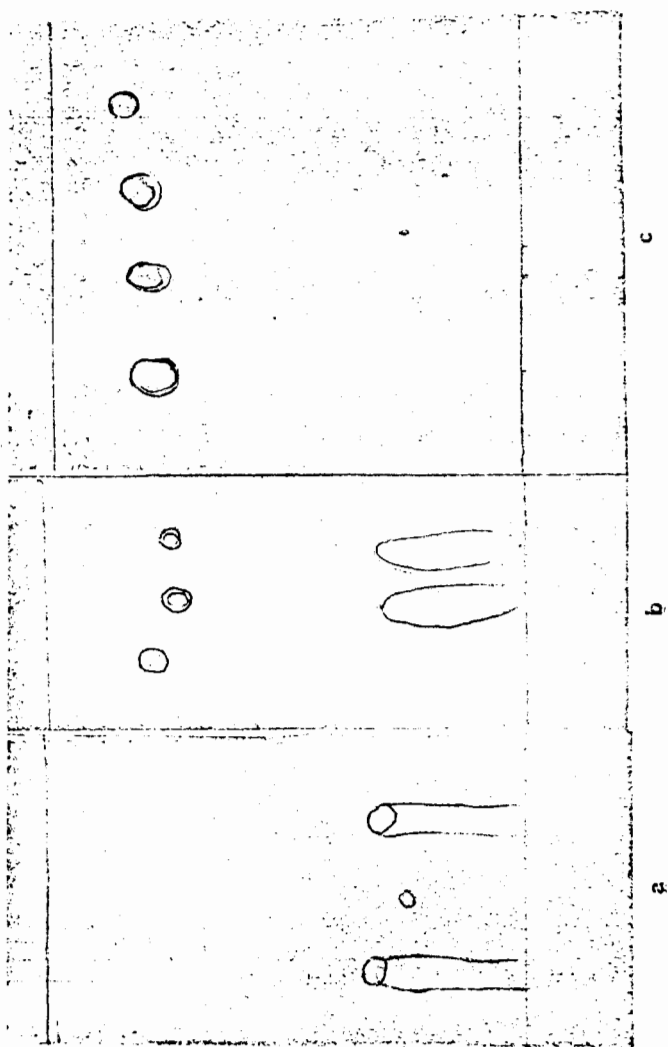


FIGURA 35.- Influencia del POF sobre los RF
(de izquierda a derecha)

- a.- POF + 0,5 μ g. Dipterex; 0,2 μ g. Dipterex; POF + 1 μ g. Dipterex.
- b.- 0,1 μ g. Sevin; POF + 0,1 μ g. Sevin; POF + 0,05 μ g. Sevin.
- c.- POF + 2 μ g. Lindano; POF + 2 μ g. DDT; 2 μ g. Lindano; 2 μ g. DDT.

El LINDANO	de Rf = 0,81,	con POE	puede llegar a 0,78
El DDT	" Rf = 0,84	" " "	" " 0,80
El SEVIN	" Rf = 0,78	" " "	" " 0,73
El DIPTEREX	" Rf = 0,24	" " "	" " 0,31

En el Dipterex, se ha podido comprobar que con distintas cantidades de POE, queda siempre a la cabeza de la cola formada por este y que puede verse azulada a la luz de Wood después de pulverizada la placa con monoetanolamina y mantenida a 110°C durante 20 minutos.

Una vez constatado que ambos pesticidas, Sevín y Dipterex, pueden ser detectados por cromatografía en capa fina con igual sensibilidad que en el método enzimático, y a pesar de la presencia del polietilenglicol 400 así como del Lindano y DDT, se han examinado las distintas muestras, cargadas con estos pesticidas.

En el Cuadro XXII se exponen los Rf de las distintas manchas que dieron las muestras después de haber sido cargadas con Sevín y Dipterex.

COMPORTAMIENTO DE LAS DISTINTAS MUESTRAS EN CAPA
FINA

MUESTRA	LUZ DE WOOD	MONOETANOLAMINA - 110°/20'		
		LUZ NATURAL	LUZ WOOD	NO ₃ Ag - UV
ALUBIAS Fig. 36a	-	-	<u>0,71</u>	<u>0,80</u> = oscura
MAIZ Fig. 36d	0,71	0,50 = amarilla	<u>0,71</u> 0,5	
REPOLLO Fig. 36c	0,57	0,57 = amarilla 0,81 = verde	<u>0,71</u>	0,46 = oscura 0,30 = clara
GRELOS Fig. 36b	0,57	0,57 = amarilla	<u>0,71</u>	0,35 = rosa
PATATAS Fig. 36e	0,79 0,71 0,48	0,48 = amarilla	<u>0,79</u> <u>0,71</u> 0,66	<u>0,79</u> = oscura
SUELO Fig. 36f	0,79 0,71 0,48	0,48 = amarilla	<u>0,79</u> <u>0,71</u> 0,48	<u>0,79</u> = oscura

(Los Rf subrallados son los que resultaron ser debidos a
DDT - Lindano y Sevin)

CUADRO XXII

El Rf del dipterex no aparece en el cuadro por variar éste con la cantidad de polietilenglicol que no resulta siempre la misma como puede notarse en la Fig. 36. En el suelo, patata y maíz es más difícil de ver que en repollo, grelos y alubias pues en aquellas muestras los colorantes quedan en la zona del polietilenglicol, mientras que en alubias aparece poco colorante, y en Grelos y Repollo, una parte de los pigmentos se desplaza a la zona superior, quedando el resto en el depósito.

También puede observarse en el cuadro que aparece la mancha de $R_f = 0,79 - 0,80$ debida a la mezcla de Lindano-DDT contenidos en las muestras. Esta mancha no aparece sin embargo en el maíz, con menor proporción de estos pesticidas, ni en repollo y grelos, en los que queda oculta por los colorantes que se desplazan hacia esta zona.

En las muestras sin cargar no se ha detectado Dipterex. En cambio, si se ha comprobado la presencia de Sevín en muestras de suelos, solamente.

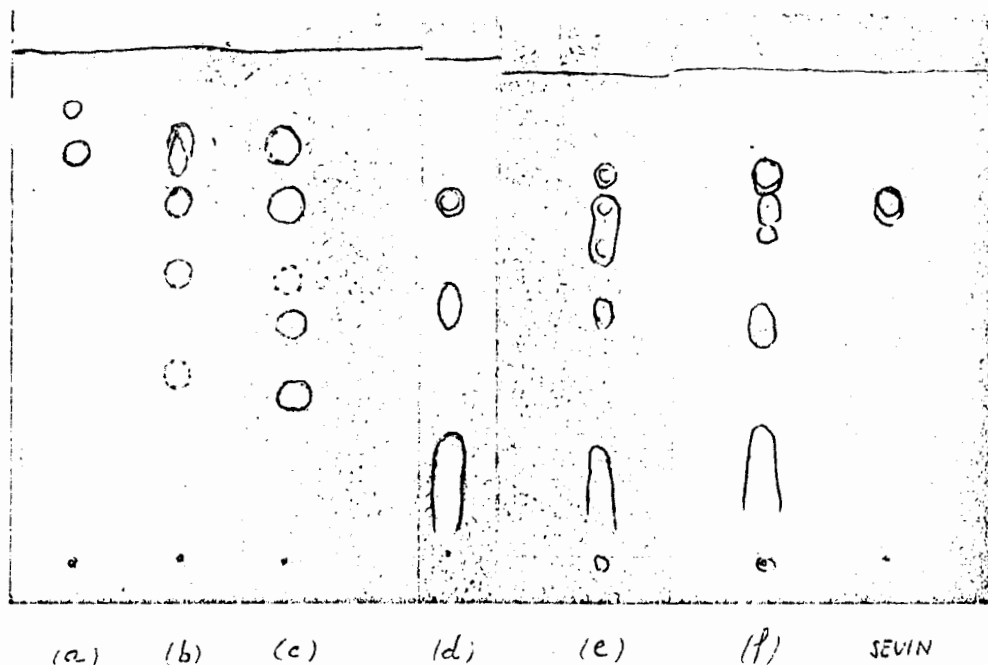


FIGURA 36.- Comportamiento de las distintas muestras en cromatografía en capa fina:
a) Alubias; b) Grapes; c) Papollo; d) Maiz; e) Patata y f) suelo.

3.11.- RESULTADOS Y DISCUSION:

En este capítulo se expondran primero los resultados mediante cromatografía en fase de vapor en los extractos etéreos y a continuación, los valores obtenidos, mediante el procedimiento enzimático, en los extractos de diclorometano.

3.11.1.- Resultados en los extractos etereos:

Los resultados hallados en cromatografía gas-líquido para las diferentes muestras, expresados en materia fresca y en ppm (mg./Kg.), se encuentran agrupados en los cuadros XXIII, XXIV y XXV correspondiendo respectivamente a las muestras de suelos en zona A y B y a los productos agrícolas recolectados a lo largo del estudio.

A la vista de los resultados encontrados para el Lindano puede observarse que prescindiendo de tres datos de la zona A, el resto podrían pertenecer a una misma población para ambas zonas.

Aquellos valores excepcionales se han encontrado coincidiendo con las fechas de aplica-

CUADRO XXIII

RESULTADOS DE LINDANO Y DDT EN MATERIA HUMEDA DE SUELO "A"

(mg./Kg.)

SUELO "A"	LINDANO	pp'DDE	op'DDT	pp'DDT	COTE total
SA-2-72	0,0030	0,0036	0,0037	0,0130	0,0253
SA-3-72	0,0023	0,0107	0,0029	0,0150	0,0286
SA-4-72	0,0022	0,0116	0,0015	0,0156	0,0287
SA-5-72	0,0020	0,0024	0,0053	0,0119	0,0196
SA-6-72	0,0036	0,0026	0,0033	0,0117	0,0176
SA-9-72	0,0025	0,0021	0,0070	0,0136	0,0277
SA-10-72	0,0038	0,0040	0,0026	0,0145	0,0211
SA-11-72	0,0017	0,0037	0,0035	0,0128	0,0200
SA-12-72	0,0018	0,0019	0,0021	0,0066	0,0166
SA-3-73	0,0030	0,0035	0,0030	0,0103	0,0168
SA-4-73	0,0026	0,0023	0,0011	0,0072	0,0106
SA-5-73	0,0015	0,0033	0,0023	0,0093	0,0149
SA-6-73	0,0038	0,0041	0,0050	0,0106	0,0197
SA-7-73	0,0041	0,0040	0,025	0,0099	0,0164
SA-10-73	0,0023	0,0037	0,0025	0,0108	0,0170
SA-11-73	0,0016	0,0033	0,0035	0,0114	0,0182
SA-12-73	0,0018	0,0035	0,0029	0,123	0,0127
SA-2-74	0,0020	0,0079	0,0074	0,0129	0,0242
SA-10-74	0,0015	0,0017	0,0012	0,0038	0,0132
SA-4-75	0,0021	0,0020	0,0014	0,0062	0,0117

CUADRO XXIV

RESULTADOS DE LINDANO Y DDT EN MATERIA HUMEDA DE SUELO "B"

(mg./Kg.)

SUELO ZONA "B"	LINDANO	pp'DDE	op'DDT	pp'DDT	COTE
SB-2-72	0,0023	0,0082	0,0014	0,0086	0,0183
SB-3-72	0,0025	0,0085	0,0011	0,0086	0,0182
SB-4-72	0,0026	0,0086	0,0008	0,0088	0,0182
SB-5-72	0,0034	0,0020	0,0034	0,0086	0,0140
SB-6-72	0,0025	0,0019	0,0115	0,0224	0,0358
SB-9-72	0,0033	0,0043	0,0041	0,0115	0,0204
SB-10-72	0,0034	0,0027	0,0048	0,0178	0,0251
SB-11-72	0,0032	0,0026	0,0064	0,0144	0,0234
SB-12-72	0,0021	0,0023	0,0035	0,0087	0,0145
SB-3-73	0,0018	0,0038	N.D.	0,0090	0,0126
SB-4-73	0,0035	0,0018	0,0028	0,0059	0,0103
SB-5-73	0,0020	0,0030	0,0009	0,0056	0,0095
SB-6-73	0,0020	0,0028	0,0008	0,0054	0,0090
SB-7-73	0,0026	0,0009	0,0103	0,0206	0,0318
SB-10-73	0,0023	0,0019	0,0041	0,0170	0,0230
SB-11-73	0,0012	0,0024	0,0035	0,0136	0,0190
SB-12-73	0,0015	0,0023	0,0032	0,0090	0,0145
SB-2-74	0,0015	0,0035	0,0030	0,0110	0,0175
SB-10-74	0,0016	0,0014	0,0043	0,0172	0,0229
SB-4-75	0,0020	0,0015	0,0022	0,0034	0,0071

RESULTADOS DE LINDANO, DDT y PCB's EN MATERIA HUMEDAD DE
PRODUCTOS RECOLECTADOS (mg./Kg.)

MUESTRA	MATERIA SECA	LINDANO	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-Total	PCB's
G-2-72	8,83	0,0080	0,0063	0,0081	0,0157	0,0301	0,0036
G-3-73	9,07	0,0027	0,0002	0,0018	0,0054	0,0074	0,0010
G-4-73	11,21	0,0016	N.D	0,0020	0,0294	0,0314	N.D
G-11-73	9,20	0,0067	N.D	0,0027	0,0078	0,0105	N.D
P-2-72	8,10	0,0043	0,0002	0,0016	0,0043	0,0061	0,0008
P-11-72	7,92	0,0031	0,0006	0,0020	0,0293	0,0321	0,0003
P-11-73	8,40	0,0050	N.D	0,0018	0,0061	0,0079	N.D
P-9-71	20,93	0,0043	0,0013	0,0023	0,0043	0,0079	0,0002
P-9-72	25,59	0,0015	0,0004	0,0017	0,0066	0,0087	N.D
P-10-73	26,02	0,0023	0,0003	0,0012	0,0009	0,0024	N.D
M-5-71	86,17	0,0032	N.D	0,0044	0,0120	0,0164	N.D
M-10-71	84,58	0,0111	0,0050	0,0086	0,0252	0,0388	N.D
M-5-72	87,91	0,0080	0,0086	0,0040	0,0078	0,0204	N.D
M-10-72	83,69	0,0014	0,0206	0,0051	0,0010	0,0267	N.M
M-5-73	86,85	0,0042	0,0003	0,0038	0,0081	0,0122	N.D
M-10-73	83,92	0,0070	N.D	0,0006	0,0010	0,0016	N.D
A-10-71	89,50	0,0590	0,0039	0,0079	0,0184	0,0302	0,0006
A-10-72	87,80	0,0044	0,0008	0,0016	0,0037	0,0061	N.D
A-10-73	88,98	0,0072	0,0013	0,0026	0,0060	0,0099	0,0002

CUADRO XXV

ción de los insecticidas a la parcela en la lucha contra el escarabajo de la patata (Fig. 7, 5-72 y 6-73).

Ambos incrementos tienen lugar en la zona "A" y aunque las pulverizaciones con Pepril-80, (6-73), no señalan el Lindano en su composición, mas tarde pudimos comprobar la presencia de trazas de este pesticida en dicha fórmula. El hecho de no elevarse la concentración de este pesticida en la zona "B" sería explicado por no haber coincidido el cultivo de patata en la zona de toma de muestras (Fig. 7) y en consecuencia no se había pulverizado dicha zona.

Por si aquellas variaciones fuesen ocasionadas por el diferente contenido en agua de las muestras, se han calculado los valores en materia seca y en $\mu\text{g/Kg.}$ para que resulte más fácil su comparación (cuadros XXVI, XXVII y XXVIII).

También, del examen de estos nuevos datos se pueden observar variaciones análogas para el Lindano en la zona A (Fig. 37). Las líneas de tendencia de estos valores (Fig. 37, ecuaciones) muestran la evolución con el tiempo y permiten observar más claramente, una pequeñísima tendencia a disminuir en ambas zonas (pendiente negativa). Ya que aquellas elevaciones decaen brusca-

RESULTADOS DE LINDANO, DDT y PCB's EN MATERIA SECA DE SUELO "A"

($\mu\text{g.}/\text{Kg.}$)

MUESTRA	MATERIA SECA %	LINDANO	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total	PCB's
SA-2-72	75,78	3,9	11,30	4,88	17,15	33,37	2,05
SA-3-72	73,0	3,1	14,65	3,97	20,54	39,17	1,00
SA-4-72	74,19	2,9	15,63	2,02	21,02	38,68	3,12
SA-5-72	80,37	11,2	2,98	6,59	14,80	24,38	N.D
SA-6-72	79,85	4,5	3,25	4,13	14,65	22,04	1,15
SA-9-72	93,6	2,9	2,51	8,37	22,24	33,13	N.D
SA-10-72	75,4	5,0	5,30	3,44	19,23	27,98	N.D
SA-11-72	73,8	2,3	3,01	4,74	17,34	27,10	10,16
SA-12-72	78,0	2,3	2,43	2,69	8,46	13,58	1,15
SA-3-73	72,5	4,1	4,82	4,06	14,20	23,17	N.D
SA-4-73	73,8	3,5	3,11	1,49	9,75	14,36	N.M
SA-5-73	71,9	2,1	4,58	3,19	12,93	20,72	4,00
SA-6-73	79,4	7,3	5,16	6,29	3,35	24,81	4,06
SA-7-73	78,38	3,2	5,10	3,18	12,63	20,92	N.M
SA-10-73	75,67	3,0	4,88	3,30	14,28	22,46	1,00
SA-11-73	73,72	2,1	4,47	4,74	15,46	24,68	N.D
SA-12-73	78,00	2,3	4,43	5,0	15,76	22,25	N.D
SA-2-74	76,2	2,6	10,36	4,46	16,92	13,75	N.D
\bar{X}		3,79	6,00	4,25	15,59	24,78	1,54
S		2,25	4,09	1,66	3,67	7,52	2,55
AMPLITUD		2,1-11,2	1,51-15,6	1,49-8,37	8,46-22,2	13,58-39,2	1-10,2
SA-10-74	72,3	2,07	2,35	1,65	12,3	16,30	1,00
SA-4-75	73,8	2,84	2,71	1,89	8,4	13,00	N.M

CUADRO XXVI

RESULTADOS DE LINDANO, DDT y PCB's EN MATERIA SECA DE SUELO "B"

($\mu\text{g. /Kg.}$)

MUESTRA	MATERIA SECA %	LINDANO	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-totál	PCB's
SB-2-72	74,79	3,07	10,96	1,87	11,50	24,40	1,30
SB-3-72	71,79	3,48	11,84	1,53	11,97	16,91	N.M
SB-4-72	74,38	3,49	11,56	1,07	11,83	24,46	N.M
SB-5-72	77,89	4,36	2,56	4,36	11,04	17,97	1,61
SB-6-72	80,2	3,11	2,36	14,33	27,93	44,63	8,77
SB-9-72	81,79	4,03	5,86	5,01	14,06	24,94	N.D
SB-10-72	78,3	4,34	3,44	6,13	22,77	32,31	N.D
SB-11-72	72,8	4,39	3,57	8,79	19,78	32,14	N.D
SB-12-72	76,92	2,73	2,99	4,55	11,31	18,85	2,00
SB-3-73	71,5	2,51	5,31	N.D	12,58	17,9	1,30
SB-4-73	73,5	4,76	2,44	3,80	8,02	14,23	7,73
SB-5-73	73,2	2,73	4,09	1,22	7,65	12,97	N.D
SB-6-73	79,98	2,5	3,50	1,00	6,75	11,25	5,30
SB-7-73	78,50	3,31	1,14	13,12	26,24	40,50	N.D
SB-10-73	77,43	2,97	2,45	5,29	21,95	29,70	N.D
SB-11-73	72,97	1,64	3,28	4,79	18,63	26,72	3,2
SB-12-73	80,00	1,87	2,87	4,00	11,25	18,12	N.D
SB-2-74	77,9	1,92	4,49	3,85	14,12	22,46	N.D
\bar{x}		3,18	4,70	4,70	14,96	22,04	1,74
s		0,92	3,29	3,93	6,37	9,12	2,76
AMPLITUD		1,64-4,76	1,14-11,8	1,0-14,3	6,75-27,9	11,25-44,6	1,3-8,7
SE-10-74	78,00	2,05	1,92	5,51	22,05	29,48	N.D
SB-4-75	75,20	2,65	1,99	2,92	4,65	9,56	1,1

CUADRO XXVII

RESULTADOS DE LINDANO, DDT y PCB's EN MATERIA SECA DE PRODUCCION RECOLECTADOS
(ug./Kg.)

MUESTRA	MATERIA SECA	LINDANO	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total	PCB's
G-2-72	8,83	90,60	71,34	91,73	177,80	340,87	40,77
G-3-73	9,07	29,76	2,20	19,84	59,53	81,57	11,02
G-4-73	11,21	14,27	N.D	17,84	162,26	280,10	N.D
G-11-73	9,2	72,82	N.D	29,34	84,78	114,12	N.D
H-2-72	8,10	53,08	2,46	19,75	53,08	75,29	9,8
H-11-72	7,92	39,14	7,57	25,25	369,98	402,80	3,78
H-11-73	8,40	59,5	N.D	21,42	72,61	94,03	N.D
P-9-71	20,93	20,54	6,21	10,98	20,54	37,73	0,95
P-9-72	25,59	5,86	1,91	8,12	31,53	41,56	N.D
P-10-73	26,02	8,83	1,43	5,73	4,3	11,46	N.D
M-5-71	86,17	3,71	N.D	5,10	13,92	19,02	N.D
M-10-71	84,58	13,12	5,91	10,16	29,79	45,86	N.D
M-5-72	87,91	9,10	9,78	4,55	8,87	23,20	N.D
M-10-72	83,69	1,67	24,61	6,09	1,19	31,89	N.M
M-5-72	86,85	4,83	0,34	4,37	9,32	14,03	N.D
M-10-73	83,92	8,34	N.D	0,71	1,19	1,90	N.D
A-10-71	89,50	65,92	4,35	8,82	20,55	23,72	0,67
A-10-72	87,80	5,01	0,91	1,82	4,21	6,94	N.D
A-10-73	88,98	8,09	1,46	2,92	6,74	11,12	0,22

CUADRO XXVIII

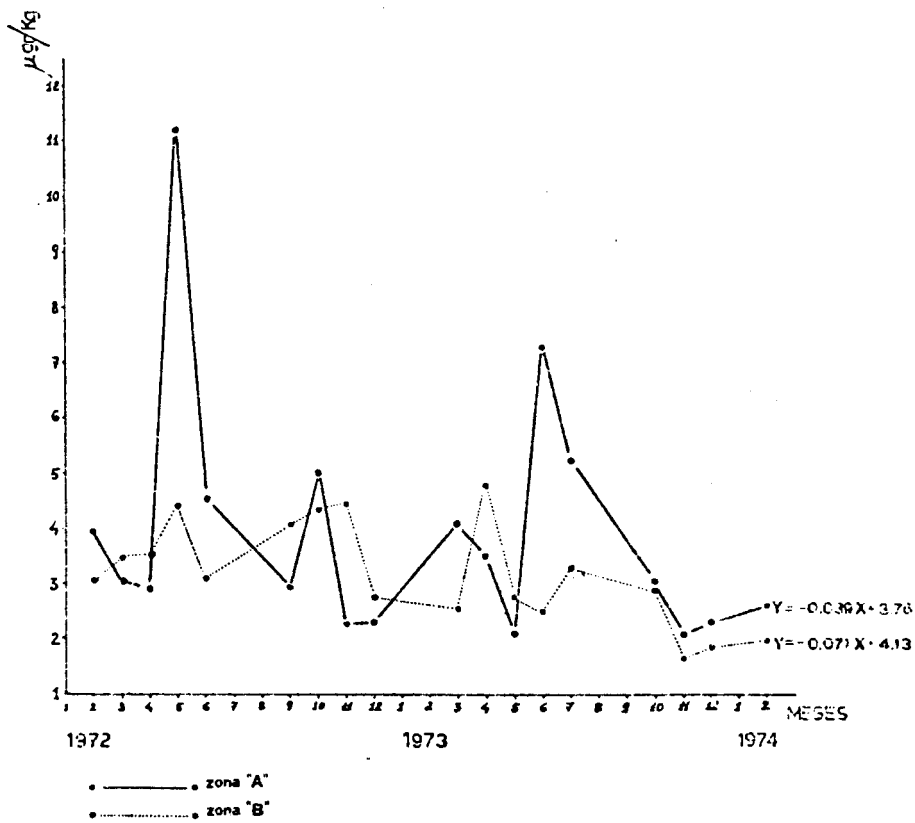


FIGURA 37.- Lindano en materia seca de suelos A y B ($\mu\text{g./Kg}$)

camente, las líneas de tendencia se obtuvieron prescindiendo de aquellos valores elevados

Por otro lado, estos resultados, incluidos aquellos más destacados son muy bajos y no solo en el suelo, sino también en los productos recolectados e incluso en los que directamente fueron aplicadas las formulaciones. Compárese los valores encontrados para estos productos (Cuadros XXV y XXVIII) con los admitidos como tolerables por el comité mixto de la FAO/OMS (24): para hortalizas 3 ppm en materia del mercado y en cereales crudos 0,5 ppm.

De forma análoga, los resultados encontrados para los residuos de isómeros del DDT, se han representado gráficamente (Fig. 38 y 39).

Hay que pensar que si el DDT no fué incorporado al terreno en esos años, las gráficas de sus isómeros sufrirían variaciones simultáneas con tendencia a la pérdida de concentración, que dependerían de diversos factores climáticos, degradación, volatilización, etc.... Estas variaciones simultáneas no habría que esperar fuesen paralelas para los distintos isómeros ya que responden en distinta medida a estos factores.

Los valores de concentración de un mes,

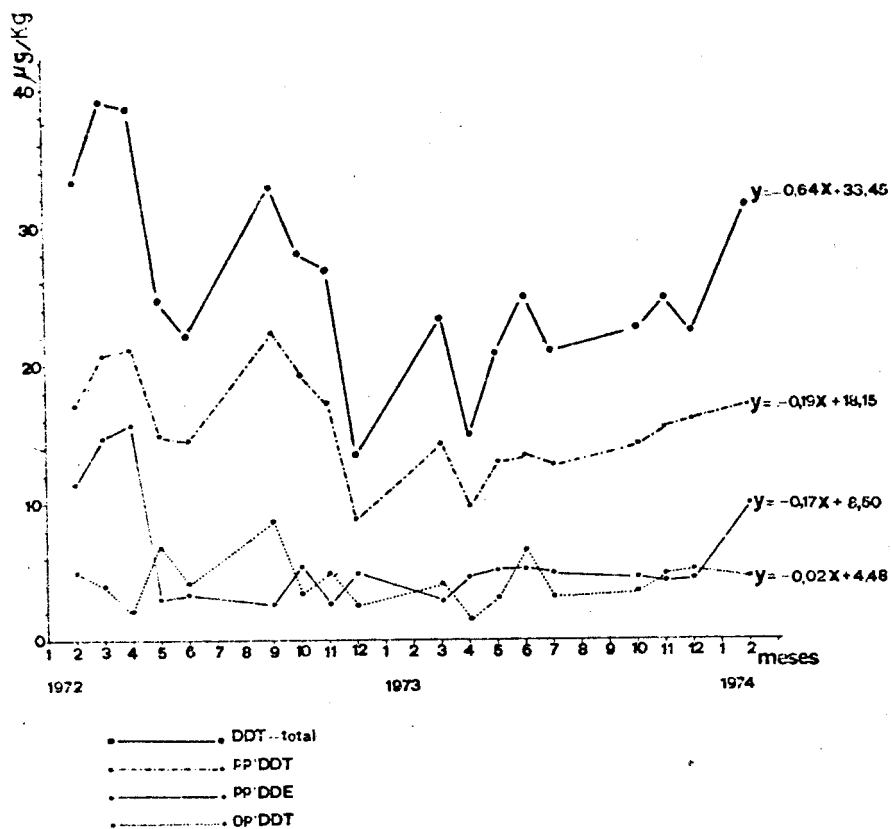


FIGURA 38.- Isómeros del DDT en materia seca de suelo A (µg./Kg.)

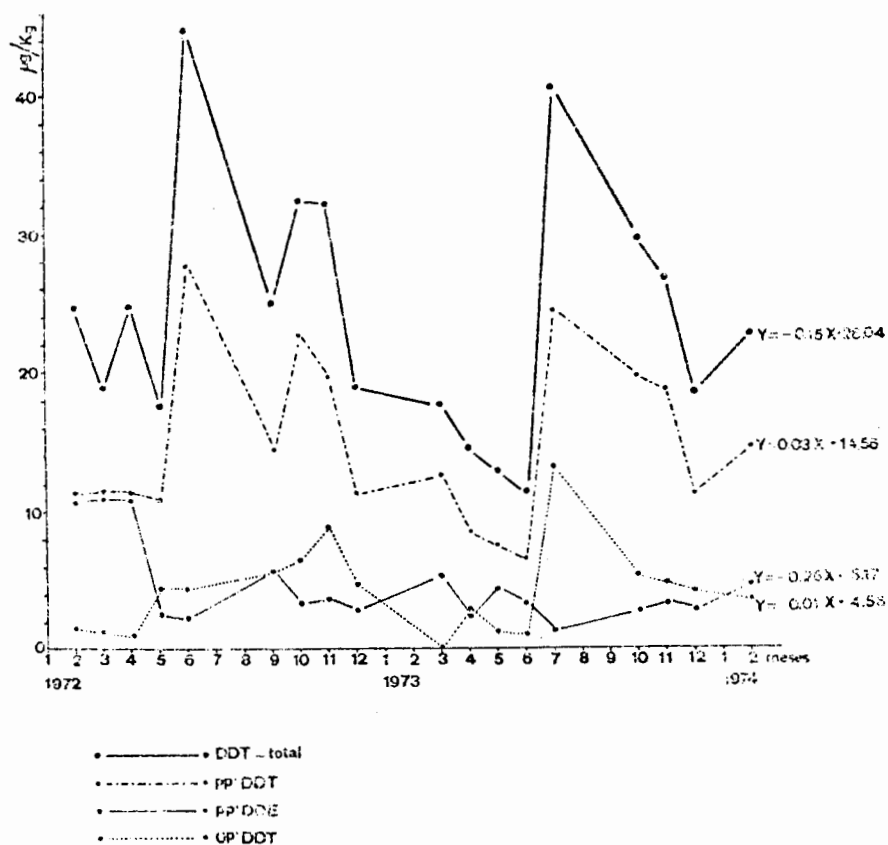


FIGURA 59.- Isómero del DDT en materia seca de suelo B ($\mu\text{g./Kg.}$)

pueden llegar a invertirse en el siguiente sin otro cambio por ejemplo que un laboreo del terreno. Actualmente es conocida la distribución vertical de este pesticida (138); hasta unos 5 cm. de profundidad es mayor la proporción de pp'DDE que la de op'DDT, valores que se invierten entre los 15 y 25 cm. La misma inversión cabría esperar si consideramos la tendencia del DDT a transformarse en último término en el isómero pp'DDE.

Cuando el incremento de DDT total, se ve acompañado de una subida de los isómeros op'DDT y pp'DDT pero no de pp'DDE, hay que pensar que este incremento será debido a una nueva incorporación de DDT técnico al terreno, ya que este producto contiene una mayor proporción de aquellos isómeros.

Cuando el incremento que tiene lugar es en igual medida para pp'DDE, op'DDT y pp'DDT hay que pensar que por circunstancias no conocidas hay un aumento de DDT en esa zona pero de procedencia interna es decir, del mismo terreno.

En la zona A (Fig. 38) a penas si hay variaciones bruscas. Sin embargo, la del 9-72 parece indicar que hubo un aporte externo ya que el pp'DDE permanece constante.

En la zona "B" se aprecian dos variaciones bruscas: las del 6-72 y las del 7-73, ambas coincidiendo con las pulverizaciones, si bien en esta zona no fueron aplicadas. (Fig. 39)

Sin embargo, el hecho de que el gran incremento del pp'DDT no fuese seguido de un incremento paralelo de los otros dos isómeros, parecía indicar una procedencia externa.

Todas estas variaciones que indican una procedencia externa, que por otro lado solo puede ser debida a las simientes empleadas o a las formulaciones aplicadas, nos llevaron a un análisis de estas muestras.

Debido a que las épocas de laboreo se vieron acompañadas en casi todos los casos de incrementos en los pesticidas, se pensó si el maíz sembrado inmediatamente después, podría ser el causante de estos incrementos, cosa bastante factible por haberse utilizado maíz tratado.

Consultando a las casas productoras del maíz sembrado, Pioner 381 y Pioner 383, contenían además de una materia colorante para evitar su uso en alimentación animal y humana, un fungicida, el Ortocide o Captan, como pudo ser comprobado (Fig. 40). Este pesticida, no llega

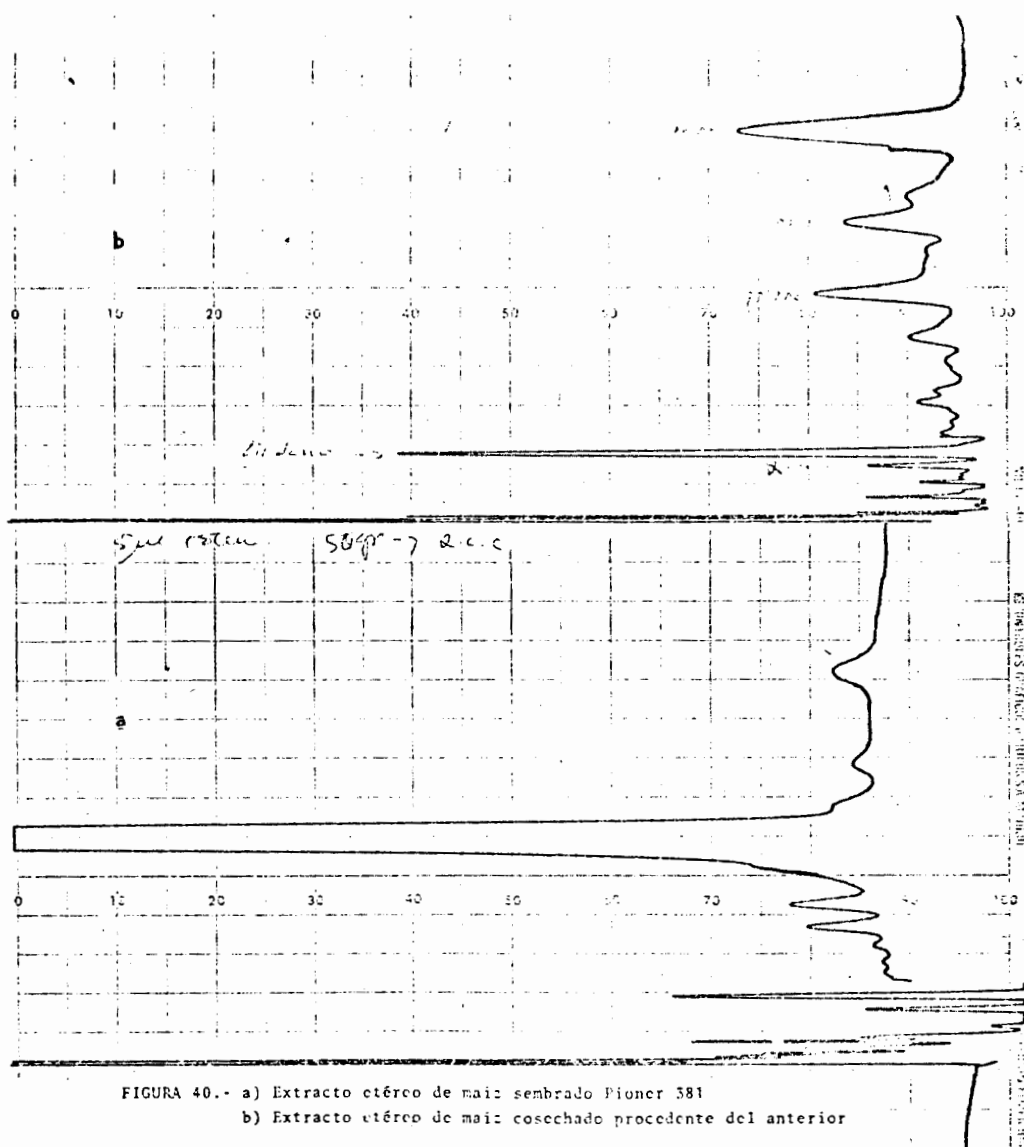
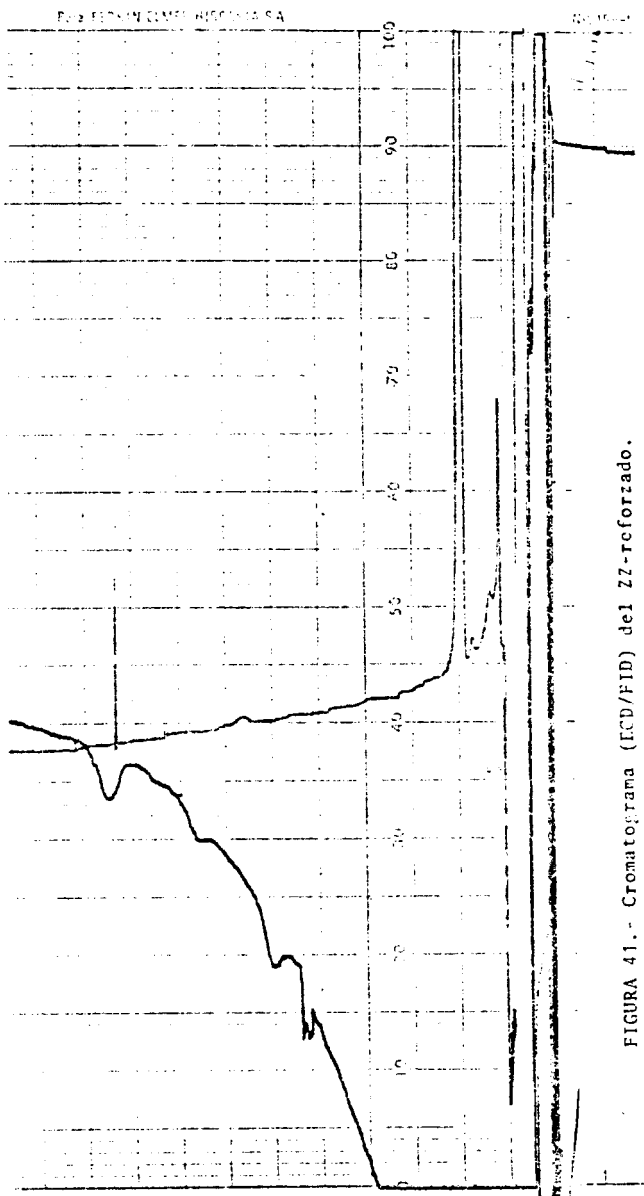


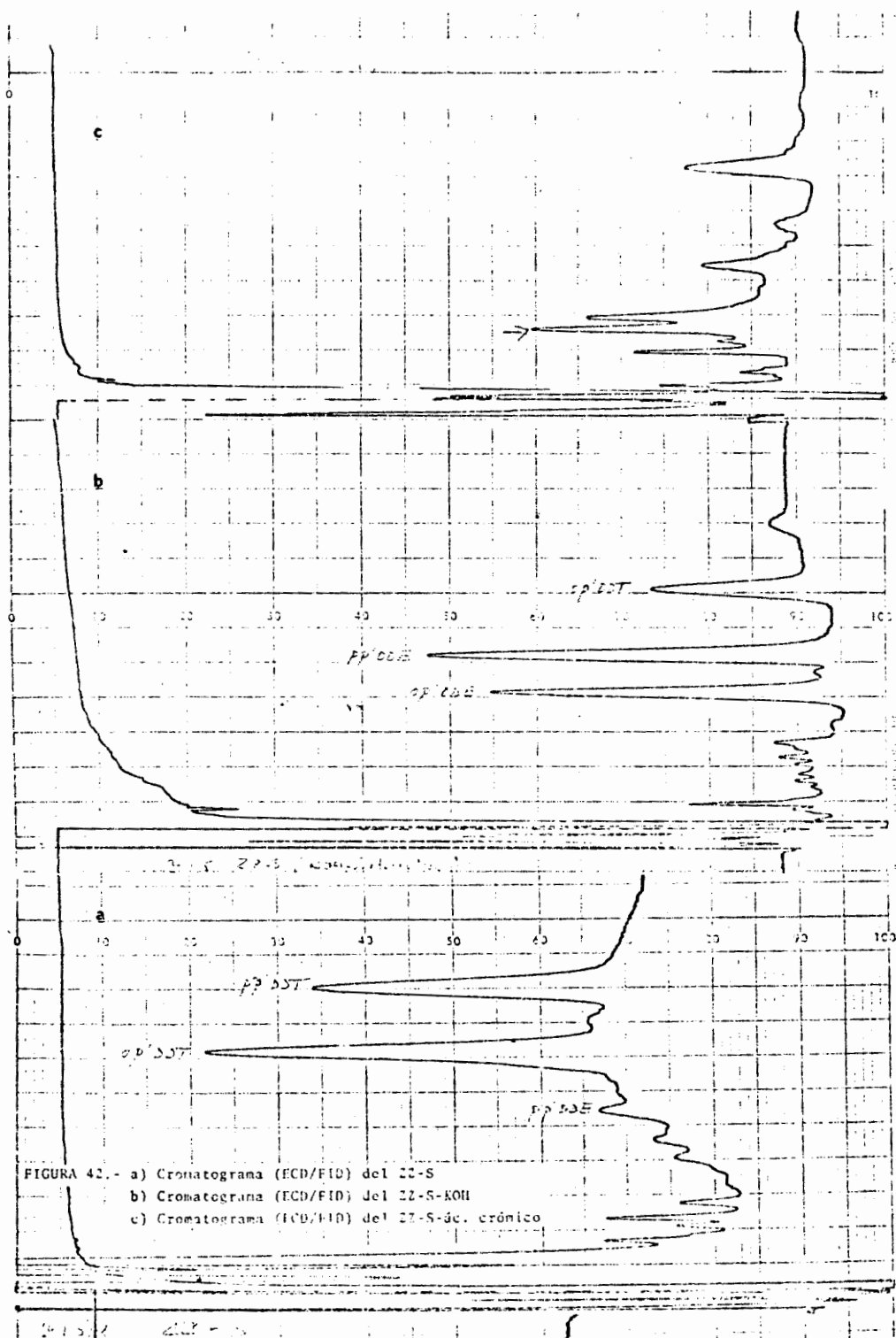
FIGURA 40.- a) Extracto etéreo de maíz sembrado Pioneer 381
b) Extracto etéreo de maíz cosechado procedente del anterior

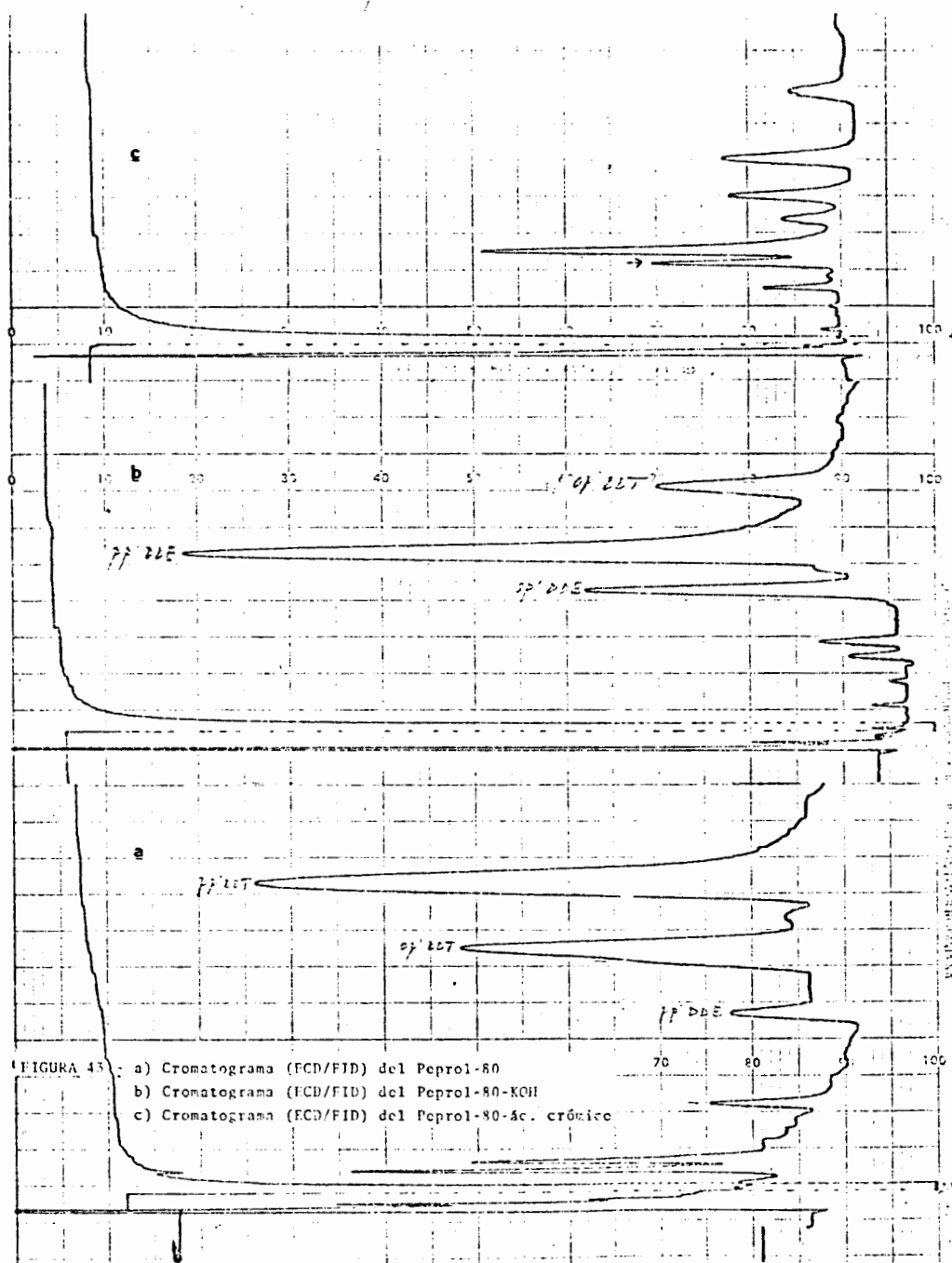
a detectarse en el maíz recolectado (Fig. 21), al menos en las condiciones de trabajo seguidas, lo cual es bastante lógico por otra parte ya que en el maíz tratado, siguiendo nuestro procedimiento en el que no se utiliza un disolvente muy favorable para este pesticida, solo se estiman unas 0,125 ppm. Estos maíces sembrados, no presentan DDT y Lindano en niveles importantes (cuadro XXV) que explicasen aquellos cambios.

Las demás simientes empleadas, no tenían tratamiento alguno.

El análisis de las formulaciones aplicadas, ZZ-reforzado, ZZ-S y Peprol-80, que según la referencia del envase contenían: Lindano al 11% y Sevín al 55% el primero; Sevín al 50% el segundo y Dipterex al 80% el tercero, fueron analizadas obteniéndose con cada una los cromatogramas de las figuras 41, 42 y 43, en los cuales, sobre todo en los dos últimos aparecen picos con Trr correspondientes al op'DDT y pp'DDT. El ZZ-reforzado, por su alto contenido en Lindano que incluso es detectado en FID deja entrever los isómeros del DDT en el cromatograma con ECD. En las otras dos formulaciones, los valores "p" obtenidos para hexano-etanol 90% (v/v) han sido 0,75 para el de Trr más bajo y de 0,65 para el otro, coincidentes con los hallados







para patrones de op'DDT y pp'DDT respectivamente. Además, sometidos a las pruebas químicas habituales, ambos componentes se transforman en los isómeros op'DDE y pp'DDE (Fig. 42b y 43b), en la de saponificación; así como en la prueba de ácido crómico, se logra la transformación del pp'DDE en la benzofenona de Trr 0,86 (Fig. 42c y 43c).

El contenido de DDT en estas formulaciones resultó ser de un 0,2% en el Pepról-80 y de un 0,02% en el ZZ-S, por ello su presencia no ha podido confirmarse empleando otros métodos de análisis propios de formulaciones como la espectrofotometría IR o la GLC con detector de ionización de llama de hidrógeno muy apropiados para mayores concentraciones de pesticida.

El Lindano también ha sido detectado en el Pepról-80 a pesar de no figurar en su composición, si bien su cantidad puede ser estimada como máximo en un 0,004%.

A pesar de lo señalado, puede observarse:

- 1°.- Que en las Fig. 38 y 39 (ecuaciones) las líneas de tendencia de todos los isómeros del DDT muestran pendiente negativa en la zona "A". En la zona "B", los incrementos brus-

cos ocasionan una ligera pendiente positiva en los isómeros op'DDT y pp'DDT, siendo encambio negativa la del pp'DDE al cual tienden a degradarse, así como la del DDT-total

- 2°.- Que comparando las dos series de 18 valores obtenidas para cada pesticida correspondientes a la zona "A" y "B", resultaron pertenecer a una misma población por presentar la "t", valores inferiores al correspondiente para 34 grados de libertad con un 95% de probabilidades. Esto se cumple incluso para aquellos casos mencionados de valores elevados de lindano en una de las zonas.

En el muestreo de las cosechas que se hizo a lo largo del estudio, las cantidades de DDT encontradas, al igual que las de Lindano, no se acercan a los límites establecidos por la FAO/OMS

en 1.970 (última fecha de utilización autorizada de este insecticida), como tolerables=7 ppm.

Comparando las muestras entre sí, (Cuadro XXV), puede notarse que las patatas no tienen más residuos que las otras muestras, así como los granos de maíz y alubias cultivados simultáneamente con aquellas, no presentan más residuos que repo-

llo y grelos, lo cual hace pensar que dichos residuos sean procedentes del suelo, y no tengan influencia las pulverizaciones utilizadas.

En cuanto a la comparación de estos resultados con los obtenidos en suelo (cuadros XXIII, XXIV y XXV), se observa que el Lindano y DDT se encuentran en magnitudes del mismo orden para todas las muestras excepto en la de patata en que el DDT total fué siempre inferior.

Los valores de PCB's encontrados tanto en suelo como en cosechas han sido muy bajos y en el suelo, al igual que los pesticidas, dieron una distribución análoga en ambas zonas "A" y "B".

La presencia de hidrocarburos solo ha sido detectada en algunas muestras de tierra y nunca en los alimentos de ella recogidos.

3.11.2.- Resultados en los extractos de diclorometano.

Como hemos indicado, en el método analítico basado en el poder inhibidor de la colinesterasa, ante la falta de especificidad estamos obligados a expresar el resultado en unidades Sevín por la imposibilidad de conocer con dicha técnica los posibles inhibidores.

Los resultados obtenidos en el último lote

de productos recolectados ya han sido evaluados al estudiar la recuperación del Sevín (Cuadro XIX) pues como de él se deduce, las diferentes ecuaciones calculadas permiten conocer el valor en la ordenada, es decir el % de inhibición de los extractos de las diferentes muestras sin adición de pesticida. Dichos valores, llevados a la recta obtenida para el Sevín, permiten establecer un índice de residuos inhibidores de la colinesterasa expresados en "unidades sevín" (Cuadro XXIX). Estas unidades, son ocasionadas por la inhibición que pueda producir distintos componentes de la muestra por sus peculiaridades y a la inhibición debida a los residuos de pesticida de la muestra. Como puede observarse en el caso del maíz, esta inhibición es negativa lo cual quiere decir que la actividad colinesterásica del plasma con la muestra es mayor que la del plasma solo.

Analizadas estas mismas muestras por cromatografía en capa fina, resultaron contener sevín únicamente las de suelo, y ninguna de ellas contenía Dipterex. De aquí que las "unidades Sevín" del cuadro XXIX pueda decirse que son debidas únicamente a la muestra (a excepción de las correspondientes a suelo), y que habría que restárselas a las obtenidas con esos mismos productos en otras

RESULTADOS EN LOS EXTRACTOS DE DICLOROMETANO

MUESTRAS	ORDENADA	LOGARITMO DE UNIDADES SEVIN OBTENIDAS CON LA ec: $X = \frac{Y+0.6}{51.54}$	UNIDADES SEVIN	UNIDADES SEVIN EN mg, /Kg
SB-11-74	24,77	0,49	3,1	0,248
G-11-74	11,7	0,24	1,7	0,068
M-10-74	-1,28	0,013	-1,03	-0,082
A-10-74	14,49	0,29	1,9	0,159
P-10-74	26,2	0,52	3,3	0,132
R-11-74	23,6	0,47	2,9	0,116

CUADRO XXIX

fechas. En cuanto a las unidades debidas a suelo, se ha comprobado con otras muestras de 'suelo conservadas de fechas anteriores, que no sobrepasaban cifras de este mismo orden. Estas muestras de suelo, sometidas a una semicuantitativa por capa fina, dieron resultados positivos con manchas correspondientes al Sevín de unos 0,1 μ g. en los 10 μ l tomados de los 0,2 ml. de extracto, lo cual corresponde a una concentración de 0,16 mg./Kg., que restados de las 0,248 unidades obtenidas para suelo y Sevín, dan una cifra de 0,088 "unidades Sevín" para las muestra de suelo en sí. Estas, al igual que las correspondientes a productos son debidas únicamente al suelo puesto que tampoco es te contenía Dipterex.

El método propuesto permite expresar el contenido en pesticidas inhibidores, como "unidades Sevín", para lo cual una vez calculada la inhibición debida a la muestra problema, se hacen con ella los mismos cálculos que los que se exponen para la ordenada en el origen en el cuadro XXIX, y a las unidades Sevín obtenidas en mg./Kg., se les restan las que figuran en dicho cuadro (en el caso del suelo = 0,088).

CONCLUSIONES

De forma detallada se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- 1º.- *El procedimiento de extracción seguido en los métodos oficiales de la AOAC para productos secos. es aplicado con algunas modificaciones a muestras de suelos obteniéndose recuperaciones mayores del 73% para los pesticidas ensayados: Lindano, Heptaclor, Aldrin, Dieldrin y Endrin.*
- 2º.- *El método de extracción con acetonitrilo-diclorometano para Sevin en los seis tipos de muestra (suelo, grelos, patatas, alubias y maíz), también ha dado resultados de recuperación satisfactorios: 73% en repollo y superiores al 85% en el resto de las muestras.*
- 3º.- *Las recuperaciones de los pesticidas organoclorados y organofosforados de una solución patrón mixta a lo largo del proceso de purificación en columna de florisil-sulfato sódico, han sido las siguientes: Hentaclor = 87%; Malatión = 97%; Heptaclor epóxido = 93%; Dieldrin = 100%; Etión = 97%; Tritión = 83%.*

40.- Se comprueba que la sensibilidad de un detector de ionización de llama alcalina (detector termoiónico preparado por nosotros), es 100, 50 y 25 veces más sensible que el detector de captura de electrones para Malatión, Etión y Tritión respectivamente.

50.- Los límites de detección alcanzados en las condiciones de trabajo reseñadas, para algunos pesticidas ensauados, han sido los siguientes:

PESTICIDAS	ECD (ng)	KC1TD (ng)
Lindano	0,009	(*)
Malatión	0,5	0,02
Etión	0,15	0,009
Tritión	0,15	0,018
op'DDT	0,09	(*)
pp'DDE	0,02	(*)
pp'DDT	0,09	(*)

(*).- no es posible establecerla por requerirse una cantidad tan elevada que bloquearía el detector de captura de electrones.

69.- Se han identificado en las muestras, Lindano, isómeros del DDT y policlorobifenilos, utilizándose en su confirmación: tiempos de retención relativos al Aldrin en dos columnas de diferente polaridad; los llamados valores "p"; pruebas químicas, fundamentalmente: saponificación con potasa y oxidación con ácido crómico y radiaciones ultravioleta.

70.- Se presentan los resultados obtenidos para pesticidas organoclorados y policlorobifenilos en las diferentes muestras de suelos y productos recolectados a lo largo de cinco años, estudiando su significado y persistencia.

Los valores promedios de dichos residuos fueron los siguientes:

PESTICIDA	SUELO A	SUELO B	MAIZ	REPO-LLO	GRELOS	ALU-BIAS	PATATAS
Lindano	0,0030	0,0024	0,0058	0,0041	0,0047	0,0235	0,0027
pp'DDE	0,0045	0,0035	0,0057	0,002	0,0016	0,0020	0,0007
op'DDT	0,0032	0,0036	0,0054	0,0018	0,0036	0,0040	0,0017
pp'DDT	0,0119	0,0114	0,0092	0,0132	0,0146	0,0094	0,0039
PCB's	0,0015	0,0017	N.D	0,0004	0,0011	0,0002	N.D

Por lo que todos los datos son varias veces inferiores a los señalados por la FAO/OMS.

Con los resultados obtenidos de las muestras de suelos se han obtenido las siguientes líneas de tendencia:

	ZONA "A"	ZONA "B"
Lindano	$Y = -0,04X + 3,76$	$Y = -0,07X + 4,13$
pp'DDE	$Y = -0,17X + 8,50$	$Y = -0,026X + 8,17$
op'DDT	$Y = -0,02X + 4,48$	$Y = 0,01X + 4,56$
pp'DDT	$Y = -0,19X + 18,15$	$Y = 0,03X + 14,56$
DDT-total	$Y = -0,64X + 33,45$	$Y = -0,15X + 26,04$
PCB's	$Y = -0,05X + 2,3$	$Y = -0,02X + 2,04$

X = número de orden del mes

Y = $\mu\text{g/g.}$ en materia seca

Como puede observarse, las cantidades iniciales son bajas (ordenada en el origen), y existe una tendencia a la disminución (pendiente negativa). Aun cuando el op'DDT y pp'DDT en la zona "B" presentan pendiente positiva, su pequeña magnitud y la pendiente negativa del DDT total en dicha zona, permiten concluir la existencia de una lenta desaparición de estos compuestos en el suelo y ello a pesar de encontrarse en pequeñas proporciones en las pulverizaciones aplicadas.

- 80.- Se comprueba la presencia de isómeros del DDT y Lindano en las formulaciones empleadas aunque estos pesticidas no figuraban declarados en su composición. No obstante estos valores no alcanzaron cifras superiores al 0,2%.
- 90.- Se propone un método basado en la medida potenciométrica de la actividad colinesterásica de plasma de caballo, para la detección de residuos inhibidores. Dicho método tiene gran precisión y se obtienen los siguientes límites de detección para pesticidas fosforados y carbamatos: Sevín = 1,5 µg.; Dipterex = 5,5 µg.; Malatión = 8 µg. y Pirolan = 0,6 µg.
- 100.- Al aplicar aquella técnica a muestras cargadas con Sevín y Dipterex, solo se obtienen buenos resultados con el primero. para el que los porcentajes de recuperación en todo el proceso de análisis han sido los siguientes: suelo = 87%; repollo = 72%; grelos = 93%; patatas = 96%; alubias = 86%; maíz = 115%.

Los resultados con Dipterex han sido muy irregulares, lo que atribuimos a una posible degradación por las condiciones en que se efectúa la valoración (38°C y pH = 7,40) y también a su rápida pérdida de actividad en condiciones ambientales (véase conclusión siguiente), condiciones que se rozan al sobrecargar la muestra.

119.- Mediante el procedimiento anterior se ha comprobado que mientras el Sevin pierde un 8% de actividad en el transcurso de un mes estando en sequedad y expuesto a las condiciones ambientales, el Dipterex deja de ser activo a los tres días de permanecer en iguales condiciones.

120.- Con este método enzimático, se establecen mediante sobrecarga los niveles de inhibición de las muestras que expresados en "unidades Sevin" resultaron ser:
Suelo 0,248; repollo 0,116; grelos 0,068; patatas 0,132; alubias 0,152; maíz 0,082.

Tras aplicar cromatografía en capa fina, investigando la presencia de Dipterex o Sevin (con los que habian sido tratadas las muestras), solo se encontró Sevin en suelo por lo que las inhibiciones arriba mencionadas, a excepción de la del suelo, se consideran correspondientes a las propias muestras y no debidas a dichos pesticidas, circunstancia ha tener en cuenta en la interpretación de los resultados.

130.- Finalmente, aunque han sido encontrados residuos de hidrocarburos esporádicamente en muestras de suelos, no aparecen en ningún caso en productos recolectados de la parcela, por lo que no se plantea ningún problemática en la aceptación de tales alimentos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- REYNOLDS, H.T. y METCALF, R.L. (1.962).- *J. Econ. Entomol.* 55, 2.
- 2.- EDWARDS, C.A. (1.966).- *Residue Rev.*, 13, 91.
- 3.- LAMBERT, S.M. (1.967).- *J. Agr. Food Chem.* 15, 572.
- 4.- HARRIS, C.I. (1.969).- *J. Agr. Food Chem.*, 17, 80.
- 5.- GLASS, B.L. (1.972).- *J. Agr. Food. Chem.*, 20, 324.
- 6.- HARRIS, C.R. y SAND, W.W. (1.967).- *J. Agr. Food Chem.* 15, 861.
- 7.- BEALL, M.L. y NASCH, R.G. (1.969).- *Agron. J.*, 61, 571.
- 8.- WOLCOTT, A.R. (1.970).- *Michigan State University East Lansing, Mich. (U.S.A.)*, p. 128.
- 9.- MEGGIT, W.F. (1.970).- *Michigan State University East Lansing, Mich. (U.S.A.)*, p. 139.
- 10.- YOUNG - OH SHIN, CHODAN, J.J. y WOLCOTT, A.R. (1.970).- *J. Agr. Food. Chem.*, 18, 1129.

- 11.- FARMER, W.J. (1.970).- *Proc. Annu. Calif. Weed. Conf.* 22,80.
- 12.- SWANSON, G.L., THORP, F.C. y FRIEND, R.B. (1.954).- *Soil Sci.*, 78, 379.
- 13.- BOLLEN, W.B., ROBERTS, J.E. y MORRISON, H.E. (1.958).- *J. Econ. Entomol.*, 51, 214.
- 14.- CARO, J.H. (1.971).- *J. Agr. Food Chem.*, 19, 78.
- 15.- BARROWS, H.L., CARO, J.H., ARMIGER, W.H. y EDWARDS, W.M. (1.969).- *Environ, Sci. Technol.* 3, 261.
- 16.- BURGE, W.D. (1.971).- *J. Agr. Food. Chem.*, 19, 375.
- 17.- WAY, N.J. y SCOPER, N.E.A. (1.968).- *Ann. Applied Biol.* 62, 199.
- 18.- GISH, CH. D. (1.970).- *Pesticides Monitoring Journal* 3, 241.
- 19.- EDWARDS, C.A. y THOMPSON, A.R. (1.973).- *Residue Rev.* 45, 1.
- 20.- LICHTENSTEIN, E.P., FUHREMANN, T.W. y SCHULZ, K.R. (1.968).- *J. Agr. Food Chem.* 16, 348.
- 21.- CARRASCO, J.M^a, CUÑAT, P., MARTINEZ, M. y PRIMO, E. (1.972).- *Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 12, 463.

- 22.- SMITH, D.C. (1.971).- *Pesticide Science*, 2/2, 92-95.
- 23.- ABBOTT, D.C., HOLMES, D.C. y TATTON, J.O'G. (1.969).- *J. Sci. Fd. Agr.*, 20, 245.
- 24.- FAO/OMS (1.973).- *FAO. Estudios Agropecuarios*, núm. Roma.
- 25.- WICHMANN, H.J., PATTERSON, W.I., CLIFFORD, P.A., KLEIN, A.K. y CLABORN, H.V. (1.946).- *J. AOAC*, 29, 188.
- 26.- GUNTHER, F.A. y BLINN, R.C. (1.955).- *Interscience*, New York (USA).
- 27.- KLEIN, A.K. (1.958).- *J. AOAC*, 41, 551.
- 28.- KLEIN, A.K., LAUG, E.P. y SHEEHAN, J.D. (1.959).- *J. AOAC*, 42, 539.
- 29.- CHIBA, M. y MORLEY, H.V. (1.968).- *J. Agr. Food. Chem* 16, 916.
- 30.- LICHTENSTEIN, E.P. (1.959).- *J. Agr. Food. Chem.*, 7, 430.
- 31.- MILLS, P.A. (1.959).- *J. AOAC*, 42, 734.
- 32.- JOHNSON, L.Y. (1.962).- *J. AOAC*, 45, 363.
- 33.- MODDES, R.E.J. y COOK, J.W. (1.959).- *J. AOAC*, 42, 208

- 34.- MILLS, P.A., ONLEY, J.H. y GAITHER, R.A. (1.963).-
J. AOAC, 46, 186.
- 35.- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH EDUCATION AND WELFARE.-
Food and Drug Administration.- Pesticide Analytical
Manual (puesto al día), Vol. I.
- 36.- NELSON, R.C. (1.964).- *J. AOAC*, 47, 289.
- 37.- SAWYER, A.D. (1.966).- *J. AOAC*, 49, 643.
- 38.- FURMAN, W.B. y FEHRINGER, N.V. (1.967).- *J. AOAC*,
50, 903.
- 39.- BERTUZZI, P.F., KAMPS, L., MILES, C.I. y BURKE, J.A.
(1.967).- *J. AOAC*, 50, 623.
- 40.- BURQUE, J.A. y PORTER, M.L. (1.967).- *J. AOAC*, 50,
1260.
- 41.- WILDERMAN, M. y SHUMAN, H. (1.968).- *J. AOAC*, 51,
892.
- 42.- PORTER, M.L., GAJAN, R. y BURQUE, J.A. (1.969).- *J.*
AOAC, 52, 177.
- 43.- LAU, S.C. y MARXMILLER, R.L. (1.970).- *J. Agr. Food*
Chem. 18, 413.
- 44.- STORHERR, R.W. (1.971).- *J. AOAC*, 54, 324.

- 45.- OFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE AOAC.- *Eleventh edition* (1.970).
- 46.- STORHERR, R.W., OTT, P. y WATTS, R.R. (1.971).- *J. AOAC*. 54, 513.
- 47.- PARDUE, J.R. (1.971).- *J. AOAC*, 54, 359.
- 48.- WATTS, R.R. y STORHERR, R.W. (1.969).- *J. AOAC*, 52, 513.
- 49.- RENWALL SIV y AKERBLONT, M. (1.971).- *Residue Reviews*, 34.- F.A. Gunther ed. Springer Berlag, p.1.
- 50.- LAWS, E.Q. y WEBLEY, D.J. (1.961).- *Analyst*, 86, 249.
- 51.- SAHA, J.G., BHARATI BHAVARAJU, LEE, Y.W. y RANDELL, R.L. (1.969).- *J. Agr. Food. Chem.* 17, 877.
- 52.- LICHTENSTEIN, E.P., SCHULZ, K.R., FUHREMAN, T.W. y LIANG, T.T. (1.970).- *J. Agr. Food. Chem.*, 18, 100.
- 53.- LICHTENSTEIN, E.P., SCHULZ, K.R. y FUHREMAN, T.W. (1.971).- *Pesticides Monitoring Journal*, 5, 218.
- 54.- SAHA, J.G. (1.971).- *J. AOAC*, 54, 170.
- 55.- BONELLI, E.J. (1.965).- *Pesticide Residue Analysis Handbook*. Sect. V. Varian Aerograph, Walnut Creek, California.

- 56.- SIMAL, J., CREUS, J.M^a, CHARRO, A., BOADO, M^a A.,
DIAZ, R. y VILAS, D. (1.971).- *Anales de Bromatol.*,
XXIII, 1.
- 57.- GRUSSENDORF, O.W., Mc GINNIS, A.J., y SOLOMON, J.
(1.970).- *J. AOAC*, 53, 1048.
- 58.- BEROZA, M., INSCOL, M.N. y BOWMAN, M.C. (1.969).-
Res. Rev. 30, 1.
- 59.- BECKMAN, H., y BEVENUE, A. (1.963).- *J. Agr. Food
Chem.*, 11, 479.
- 60.- CAREY, W.F. (1.963).- *J. AOAC*, 46, 876.
- 61.- CULLEN, T.E. y STANOVICK, R.P. (1.965).- *J. Agr.
Food Chem.* 13, 118.
- 62.- MCLEOD, H.A., MENDOZA, C., WALES, P. y MCKINLEY, W.
P. (1.967).- *J. AOAC*, 50, 1216.
- 63.- MORLEY, H.V. (1.966).- *Residue Reviews*, 16. F.A.
Gunther ed. Springer. Berlin, p. 1.
- 64.- ERWIN, W.R., SCHILLER, D. y HOSKINS, W.M. (1.955).-
J. Agr. Food. Chem., 3, 676.
- 65.- HOSKINS, W.M., ERWIN, W.R. y MISKUS, R. (1.958).-
J. Agr. Food Chem. 6, 914.

- 66.- BLIN, R.C., GUNTHER, F.A. y MULLA, M.S. (1.960).-
J. Econ. Entomol. 53, 1129.
- 67.- ADAMS, J.M., ANDERSON, C.A. y MACDOUGALL, D. (1963)
J. Agr. Food Chem., 11, 178.
- 68.- KADOUM, A. (1.968).- *Bull. Envirom. Contam. Toxicol.*
3, 354.
- 69.- BOWMAN, M.C. y YOUNG, J.R. (1.964).- *Entomology Res.*
Div., U.S.D.A. Agr. Res. Service, Tifton, Ga., Bu-
lletin ARS 33-93, junio.
- 70.- LICHTENSTEIN, E.P. y SCHULZ, K.R. (1.959).- *J. Econ.*
Entomol. 52, 118.
- 71.- LANGLOIS, B.E., STEMP, A.R. y LISKA, B.J. (1.964).-
J. Milk Food Technol. 27, 202, *J. Agr. Food Chem.* 12
243.
- 72.- BURQUE, J.A. y MALONE, B. (1.966).- *J. AOAC*, 49,
1003.
- 73.- MILLS, P.A. (1.968).- *J. AOAC*, 51, 29.
- 74.- Loc. cit. (35) sec. 121, 3.
- 75.- HALL, E.T. (1.971).- *J. AOAC*, 54, 1349.
- 76.- WESSEL, J.R. (1.967).- *J. AOAC*, 50, 430.

- 77.- OFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE AOAC.- Twelfth edition (1.975).
- 78.- BURKE, J. y JOHNSON, L. (1.961).- *Abstrs. 140th Meeting Am. Chem. Soc.*, Chicago, Illinois, Pgr. 21A.
- 79.- LOVELOCK, J.E. y LIPSKY, S.R. (1.960).- *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 431.
- 80.- LOVELOCK, J.E. (1.961).- *Anal. Chem.*, 33, 1520.
- 81.- KARMEN, A. y GIUFFRIDA, L. (1.964).- *Nature*, 201, 1204.
- 82.- BURKE, J.A. y HOLSWADE, W. (1.966).- *J. AOAC*, 49, 374.
- 83.- GIUFFRIDA, L., IVES, N.F. y BOSTWICK, D.C. (1.966).- *J. AOAC*, 49, 8.
- 84.- IVES, N.F. y GIUFFRIDA, L. (1.967).- *J. AOAC*, 50, 1.
- 85.- Loc. cit. (45).- sec. 29008 (d).
- 86.- BOADO, A., SIMAL, J., CHARRO, A. y CREUS, J.M^a. (1.975).- *Anal. Bromatol.* XXVII, 1, 63.
- 87.- SIMAL, J., CHARRO, A., CREUS, J.M^a y BOADO, A. (1.975).- *Anal. Bromatol.* XXVII, 1, 19.
- 88.- Loc. cit. (35).- sec. 211 - 16 d.

- 89.- MILLS, J.R.W. (1.972).- *J. AOAC*, 55, 1039.
- 90.- NOREN, K. (1.968).- *Analyst*, 93, 39.
- 91.- WIENCKE, W.W. y BURKE, J.A. (1.969).- *J.AOAC*, 52, 1277.
- 92.- BEROZA, M. y BOWMAN, M.C. (1.965).- *J. AOAC*, 48, 358.
- 93.- Loc. cit (35).- sec, 620.
- 94.- BANKS, K.A. y BILLS, D.D. (1.968).- *J. Chromatogr.* 33, 450.
- 95.- KAUFMAN, W.M., BILLS, D.D. y HANNAN, E.J. (1.972). *J. Agr. Food. Chem.*, 20, 628.
- 96.- HANNAN, E.J. BILLS, D.D. y HERRING, J.L. (1.973).- *J. Agr. Food. Chem.*, 21, 87.
- 97.- SAAVEDRA, M.J. (1.969).- Tesina.- Facultad de Farmacia.- Universidad de Santiago.
- 98.- CREUS, J.M. (1.970).- Tesis doctoral.- Facultad de Farmacia.- Universidad de Santiago.
- 99.- GIAN, P.A. y HALL, S.A. (1.951).- *Anal. Chem.* 23, 1830.
- 100.- FALLSCHEER, H.O. y COOK, J.W. (1.956). *J.AOAC*, 39, 691.

- 101.- ARCHER, T.E.- "*Enzymatic Methods*" en *Analytical Methods for Pesticides Plant Growth Regulators And Food Additives*. Ed. Gunter Zweig, vol. I, Academic Press, Londres, New York, (1.963).
- 102.- ACKERMANN, H. (1.968).- *J. Chromatogr.* 36, 309.
- 103.- MCKINLEY, W. P. y READ, S.J. (1.962).- *J. AOAC*, 45, 467.
- 104.- BEYNON, K.J. y STOYDIN, G. (1.965).- *Nature*, 208, 748.
- 105.- MICHEL, H.O. (1.949).- *J. Lab. Clin. Méd.*, 34, 1564.
- 106.- MESTRES, R. (1.967).- *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 60, 33.
- 107.- RENSHAW, R.R., y BACON, N.J. (1.926).- *J. Am. Chem. Soc.* 48, 1726.
- 108.- SCHECHTER, M.S. y HORSTEIN, I. (1.957).- *Advan. Pest. Control Res.*, 1, 353.
- 109.- AMMON, R. (1.933).- *Pglügers. Arch. Ges. Physiol.* 233, 486.
- 110.- BEGGS, H.G., CAREY, S. y MORRISON, D.B. (1.958).- *Am. J. Clin. Pathol.*, 30, 181.
- 111.- HESTRIN, S. (1.949).- *J. Biol. Chem.*, 180, 249.
- 112.- Loc. cit. (101). p. 373.

- 113.- PACK, D.E., OSPENSON, J. y KOHN, G.K. (1.960).-
Abstr. 138th Meeting. Am. Chem. Soc., Atlantic City,
September, 20A, 58.
- 114.- YU, CH. CH., KEARNS, C.W. y METCALF, R.L. (1.972).-
J. Agr. Food Chem., 20, 537.
- 115.- MENDOZA, C.E., GRANT, D.L. BRACELAN, D.B. y McCULLY,
K. (1.969).- *Analyst. Septiembre, 94, 805.*
- 116.- GETZ, M.E. y FRIEDMAN, S.J. (1.963).- *J. AOAC, 46,*
707.
- 117.- MENDOZA, C.E. y SHIELDS, J.B. (1.971).- *J. AOAC, 54,*
507.
- 118.- FISCHER, R. (1.968).- *Mittly Arch. Toxicol. 23, 129.*
- 119.- FISCHER, R. y PLUNGER, C. (1.965).- *Mittly Arch. To-*
xicol., 21, 101.
- 120.- RAMASAMY, M. (1.969).- *Analyst, 94, 1075.*
- 121.- BURCHFIELD, H.P. y STORRS, E.L. (1.962).- *Biochemi-*
cal Applications of Gas Chromatography. Academic
Press. New York - London, p. 113.
- 122.- SCOTT, R.P.W. y GRANT, D.W. (1.964).- *Analyst, 89,*
179.

- 89.- MILLS, J.R.W. (1.972).- *J. AOAC*, 55, 1039.
- 90.- NOREN, K. (1.968).- *Analyst*, 93, 39.
- 91.- WIENCKE, W.W. y BURKE, J.A. (1.969).- *J.AOAC*, 52, 1277.
- 92.- BEROZA, M. y BOWMAN, M.C. (1.965).- *J. AOAC*, 48, 358.
- 93.- Loc. cit (35).- sec, 620.
- 94.- BANKS, K.A. y BILLS, D.D. (1.968).- *J. Chromatogr.* 33, 450.
- 95.- KAUFMAN, W.M., BILLS, D.D. y HANNAN, E.J. (1.972).
J. Agr. Food. Chem., 20, 628.
- 96.- HANNAN, E.J. BILLS, D.D. y HERRING, J.L. (1.973).-
J. Agr. Food. Chem., 21, 87.
- 97.- SAAVEDRA, M.J. (1.969).- Tesina.- Facultad de Farmacia.- Universidad de Santiago.
- 98.- CREUS, J.M. (1.970).- Tesis doctoral.- Facultad de Farmacia.- Universidad de Santiago.
- 99.- GIAN, P.A. y HALL, S.A. (1.951).- *Anal. Chem.* 23, 1830.
- 100.- FALLSCHEER, H.O. y COOK, J.W. (1.956). *J.AOAC*, 39, 691.

- 133.- HAQUE, R., SCHMEDDING, D. y FREED, V.H. (1.973).- *Env. Sci. Technol.* (según Residue Reviews, 52, 93).
- 134.- SIMAL, J., CREUS, J.M^a y CASTAÑON, R. (1.975).- *Medicamenta*, 319, 73.
- 135.- MACDOUGALL, D. "Dylox", en *Analytical Methods for Pesticides Plant Growth Regulators and Food Additives*. Ed. Gunter Zweig, Vol. II. Academic Press, London - New York, 1.962.
- 136.- STANBURY, H.A., Jr., y MISKUS, R.- loc. cit. (135), capítulo "SEVIN".
- 137.- KAEMMERER, K. y BUNTERKOTTER, S. (1.973).- *Residue Reviews*. Vol. 46. Ed. Gunther F.A. Springer-Verlag, Berlín, 197.
- 138.- LICHTENSTEIN, E.P., FUHREMANN, T.W. y SCHULZ, K.R. (1.971).- *J. Agr. Food Chem.*, 19, 781.

